



LETÍCIA MARIA COELHO MENDONÇA

**PROTEÔMICA COMPARATIVA DA
EXPRESSÃO DA QUALIDADE SENSORIAL DE
GENÓTIPOS DE BOURBON EM AMBIENTES
DIFERENTES**

**LAVRAS - MG
2012**

LETÍCIA MARIA COELHO MENDONÇA

**PROTEÔMICA COMPARATIVA DA EXPRESSÃO DA QUALIDADE
SENSORIAL DE GENÓTIPOS DE BOURBON EM AMBIENTES
DIFERENTES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração Proteômica Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. José Donizeti Alves

**LAVRAS – MG
2012**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Mendonça, Letícia Maria Coelho.

Proteômica comparativa da expressão da qualidade sensorial de
genótipos de Bourbon em diferentes ambientes / Letícia Maria
Coelho Mendonça. – Lavras : UFLA, 2012.

82 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: José Donizeti Alves.

Bibliografia.

1. Café. 2. Qualidade. 3. Proteínas. 4. Ambiente. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 663.937

LETÍCIA MARIA COELHO MENDONÇA

**PROTEÔMICA COMPARATIVA DA EXPRESSÃO DA QUALIDADE
SENSORIAL DE GENÓTIPOS DE BOURBON EM AMBIENTES
DIFERENTES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração Proteômica Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30 de março de 2012

Dr. Flávio Meira Borém UFLA

Dr. Luciano Vilela Paiva UFLA

Dr. José Donizeti Alves

Orientador

**LAVRAS –MG
2012**

A Deus por me dar saúde, coragem e capacidade para a realização deste trabalho.

A minha avó Marieta (in Memoriam), por ter sido até onde foi possível, minha fonte de paz e alegria. Eu sei que de onde estiver, continua guiando e abençoando meus passos.

DEDICO

Aos meus pais, João e Neida, que são meus exemplos de vida, me ensinando a sempre buscar meus sonhos com a certeza de que eles estão sempre ao meu lado.

AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar a vida e tornar possível mais essa etapa.

À Universidade Federal de Lavras e ao curso de Biotecnologia Vegetal pela oportunidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pela concessão de bolsa durante o mestrado.

Ao laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM), pelo espaço e reagentes disponibilizados.

Aos meus pais, pela paciência, amor, compreensão e dedicação. A minha irmã Larissa, que mesmo nos momentos difíceis, consegue me trazer alegria. A minha tia Maria Carmem Coelho, por todo apoio e carinho durante essa fase e por toda minha vida.

Ao professor José Donizeti Alves pela orientação e disponibilidade sempre que preciso.

Ao professor Luciano Vilela Paiva pela oportunidade, apoio e orientação.

Ao professor Flávio Meira Borém, pela disponibilidade, atenção e pelas diversas contribuições no desenvolvimento deste projeto.

Ao professor Anderson Cleiton José, de forma muito especial, pela incalculável ajuda que foi essencial para meu trabalho.

À doutoranda Kalyinka que sempre com prontidão e boa vontade me ensinou e auxiliou em todas as etapas deste projeto.

Aos colegas e amigos do Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM), em especial aos funcionários, Fabrício e Heliete, por todo auxílio.

À doutoranda Luisa Pereira Figueiredo, por todas as contribuições.

Aos amigos Diego Egídio Ribeiro e Juliana Botelho, pelo auxílio nessa reta final, força e amizade.

RESUMO

A cultivar Bourbon apresenta elevado potencial para produção de cafés de alta qualidade, sendo muito valorizada no mercado de cafés especiais. Sabe-se que diversos fatores influenciam na qualidade de bebida. Acredita-se, no entanto, que a interação genótipo e ambiente apresenta uma das mais relevantes contribuições para a definição da qualidade final da bebida do café. Diversos descritores químicos e bioquímicos têm sido usados para estudar as alterações da qualidade do café, entre eles carboidratos, enzimas, lipídios e proteínas. As proteínas, além de importantes componentes na formação do sabor e aroma do café durante a torração, também possuem papel fundamental no metabolismo do grão cru, contribuindo na definição da sua composição química. Este trabalho foi realizado como o objetivo de se estudar o perfil proteômico diferencial da interação entre três genótipos de Bourbon e um de Mundo Novo cultivados em dois ambientes a fim de relacioná-los com a qualidade de bebida. Os perfis proteômicos foram obtidos por meio de eletroforese bidimensional, usando o sistema Multiphor II (GE Lifesciences), sendo os géis corados com azul de Comassie G250, com posterior análise das imagens. Foram considerados *spots* diferencialmente expressos, aqueles que apresentam diferença de expressão de pelo menos 2X e resultado significativo no teste T. Pontos proteicos que apresentaram fortes evidências de interferência na qualidade da bebida foram selecionados para posterior sequenciamento e obtenção da confirmação dessa associação. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que existem diferenças no perfil proteico de um mesmo genótipo cultivado em ambientes diferentes, mantendo-se as mesmas práticas culturais, de colheita e pós-colheita, e também, diferenças entre os três genótipos estudados quando cultivados em um mesmo ambiente e com as mesmas práticas culturais. Porém, ainda não se sabe o nível de interferência dessa variação proteica na qualidade da bebida dos cafés nem de que forma isso ocorre, após o sequenciamento, essa relação poderá ser traçada e as proteínas que realmente forem atuantes, poderão ser usadas de inúmeras formas, por exemplo, como marcadores moleculares de qualidade ou então, no melhoramento genético de cafeeiro, ajudando na obtenção de cafés de melhor qualidade. Essa pesquisa evidencia a eficiência da ferramenta proteômica em estudos de qualidade de bebida de café, gerando margem a diversos outros trabalhos futuros, que serão de suma importância.

Palavras-chave: Café. Qualidade. Proteínas. Bourbon. Ambiente.

ABSTRACT

The Bourbon cultivar has a high potential for producing high quality coffee, being very valuable for the specialty coffee market. It is known that several factors influence the beverage quality. It is believed, however, that the genotype interaction and the environment has one of the most important contribution to the final quality definition of the beverage coffee. Several chemical and biochemical descriptors have been used to study changes of quality coffee, including carbohydrates, enzymes, lipids and proteins. Proteins, besides important components in the formation of flavor and coffee aroma during roasting, also have a fundamental role in the raw grain metabolism, contributing to define their chemical composition. This work was carried out as the objective to study the differential proteomic profile of the interaction among three genotypes of Bourbon and a New World grown in two environments in order to relate them with the beverage quality. The proteomic profiles were obtained by dimensional electrophoresis, using the Multiphor II system (GE Lifesciences) and the gels stained with Comassie blue G250, with subsequent image analysis. Spots were considered differentially expressed, those having an expression difference of at least 2X, and result in significant T test.

Proteinic points that showed strong interference evidence on beverage quality were selected for further sequencing and obtaining confirmation of this association. The results obtained in this study showed that there are differences in the protein profile of the same genotype grown in different environments, while maintaining the same cultural practices, harvest and post-harvest, and also differences among three genotypes studied when grown in the same environment and with the same cultural practices. But still do not know the interference level of this proteic variation in beverage quality of the coffee or even how this occurs, after sequencing, this relation can be traced and the proteins that are actually active, can be used from many ways, for example, as molecular markers of quality or in the genetic coffee improvement, helping in obtaining better quality coffees. This research demonstrates the effectiveness of the proteomic tool in studies of beverage quality coffee, generating margin to several other future works, that will be of paramount importance.

Keywords: Coffee. Quality. Proteins. Bourbon. Environment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Géis bidimensionais referentes ao: (A) café de melhor qualidade sensorial – G1, (B) café de menor qualidade – G2, (C) café de qualidade variável – G3 de acordo com o ambiente de cultivo e (D) testemunha – G4,.....	40
Figura 2	Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os sete <i>spots</i> com diferença de abundância proteica significativa.....	41
Figura 3	Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os dois <i>spots</i> com diferença de abundância proteica significativa.....	42
Figura 4	Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os oito <i>spots</i> com diferença de abundância proteica significativa.....	43
Figura 5	Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os 10 <i>spots</i> com diferença de abundância proteica significativa.....	46
Figura 6	Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os seis <i>spots</i> com diferença de abundância proteica significativa.....	47
Figura 7	Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os quatro <i>spots</i> com diferença de abundância proteica significativa.....	48
Figura 8	Géis bidimensionais referentes ao: (A) café de melhor qualidade sensorial – G1 , (B) café de menor qualidade – G2 , (C) café de qualidade variável – G3 de acordo com o ambiente de cultivo e (D) testemunha – G4.....	51

Figura 9	Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os 18 <i>spots</i> com diferença de abundância proteica significativa.....	53
Figura 10	Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os 11 <i>spots</i> com diferença de abundância proteica significativa.....	55
Figura 11	Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os cinco <i>spots</i> com diferença de abundância proteica significativa.....	57
Figura 12	Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os 11 <i>spots</i> com diferença de abundância proteica significativa.....	59
Figura 13	Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os 8 <i>spots</i> com diferença de abundância proteica significativa.....	61
Figura 14	Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os 10 <i>spots</i> com diferença de abundância proteica significativa.....	62
Figura 15	Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os cinco <i>spots</i> com diferença de abundância proteica significativa.....	68
Figura 16	Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os 2 <i>spots</i> com diferença de abundância proteica significativa.....	69
Figura 17	Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando o <i>spot</i> com diferença de abundância proteica significativa.....	71

Figura 18	Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os cinco <i>spots</i> com diferença de abundância proteica significativa	73
Figura 19	Detalhes dos <i>spots</i> só definidos nos géis referentes ao Mundo Novo cultivados em Lavras destacados pela seta. A figura de letra A, representa o gel do genótipo cultivado em São Sebastião da Grama e a figura B, o mesmo cultivado em Lavras.....	74

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Média de notas da análise sensorial dos cafés colhidos nas safras de 2009 e 2010.	33
Tabela 1	Volume relativo dos <i>spots</i> das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e resultado significativo no teste t- <i>student</i> ($p < 0,05$)	41
Tabela 2	Volume relativo dos <i>spots</i> das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e resultado significativo no teste t- <i>student</i> ($p < 0,05$)	42
Tabela 3	Volume relativo dos <i>spots</i> das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e resultado significativo no teste t- <i>student</i> ($p < 0,05$)	43
Tabela 4	Volume relativo dos <i>spots</i> das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e resultado significativo no teste t- <i>student</i> ($p < 0,05$)	45
Tabela 5	Volume relativo dos <i>spots</i> das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e resultado significativo no teste t- <i>student</i> ($p < 0,05$)	46
Tabela 6	Volume relativo dos <i>spots</i> das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e resultado significativo no teste t- <i>student</i> ($p < 0,05$)	48
Tabela 7	Volume relativo dos <i>spots</i> das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e resultado significativo no teste t- <i>student</i> ($p < 0,05$)	52

Tabela 8	Volume relativo dos <i>spots</i> das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e resultado significativo no teste t- <i>student</i> ($p < 0,05$)	54
Tabela 9	Volume relativo dos <i>spots</i> das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e resultado significativo no teste t- <i>student</i> ($p < 0,05$)	56
Tabela 10	Volume relativo dos <i>spots</i> das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e resultado significativo no teste t- <i>student</i> ($p < 0,05$)	58
Tabela 11	Volume relativo dos <i>spots</i> das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e um resultado significativo no teste t- <i>student</i> ($p < 0,05$)	60
Tabela 12	Volume relativo dos <i>spots</i> das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e resultado significativo no teste t- <i>student</i> ($p < 0,05$)	61
Tabela 13	Varição no número de pontos proteicos com diferenças de abundância entre as mesmas análises realizadas nas cidades de Lavras e São Sebastião da Grama São Sebastião da Grama.	63
Tabela 14	Varição no número de pontos proteicos diferencialmente expressos entre as mesmas análises realizadas nas cidades de Lavras e São Sebastião da Grama	64
Tabela 15	Varição no número de pontos proteicos diferencialmente expressos entre as mesmas análises realizadas nas cidades de Lavras e São Sebastião da Grama.	65
Tabela 16	Volume relativo dos <i>spots</i> das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e um resultado significativo no teste t- <i>student</i> ($p < 0,05$)	67

Tabela 17	Volume relativo dos <i>spots</i> das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e um resultado significativo no teste t- <i>student</i> ($p < 0,05$).....	68
Tabela 18	Volume relativo dos <i>spots</i> das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e um resultado significativo no teste t- <i>student</i> ($p < 0,05$).....	70
Tabela 19	Volume relativo dos <i>spots</i> das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e um resultado significativo no teste t- <i>student</i> ($p < 0,05$).....	71

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	O café no Brasil	19
2.2	Qualidade do Bourbon	21
2.3	Qualidade de bebida do café	22
2.4	Proteínas na qualidade do café	24
2.5	Proteoma	26
2.6	Fatores que afetam a composição química do grão	28
2.6.1	Ambiente	28
2.6.2	Genótipo	30
2.6.3	Colheita e pós-colheita	31
2.6.3.1	Colheita seletiva	31
2.6.3.2	Lavagem e separação hidráulica	31
2.6.3.3	Preparo por via seca e via úmida	31
2.6.3.4	Secagem	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	Caracterização das amostras	33
3.2	Caracterização das regiões de cultivo	34
3.3	Coleta, processamento e armazenamento dos frutos	34
3.4	Análise proteômica	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	Análises de cafés cultivados em São Sebastião do Grama	39
4.1.1	Análise dos géis	39
4.1.2	Análises comparativas	40
4.1.2.1	Testemunha (Mundo Novo) x Bourbons	40
4.1.2.1.1	Mundo Novo (G4) x Bourbon de maiores notas (G1)	40

4.1.2.1.2	Mundo Novo (G4) x Bourbon de notas mais baixas (G2)	42
4.1.2.1.3	Mundo Novo (G4) x Bourbon de notas variáveis (G3).....	42
4.1.2.2	Análise entre Bourbons.....	44
4.1.2.2.1	Bourbon de notas variáveis (G3) x Bourbon de notas mais altas (G1)	44
4.1.2.2.2	Bourbon de notas variáveis (G3) e Bourbon de notas mais baixas (G2)	46
4.1.2.2.3	Bourbon de melhores notas (G1) x Bourbon de menores notas (G2).....	47
4.1.3	<i>Spots</i> mais relevantes.....	49
4.2	Análises de cafés cultivados em Lavras	50
4.2.1	Análise dos géis	51
4.2.2	Análises comparativas.....	52
4.2.2.1	Testemunha (Mundo Novo) x Bourbons	52
4.2.2.1.1	Mundo Novo (G4) x Bourbon de notas altas (G1).....	52
4.2.2.1.2	Mundo Novo (G4) x Bourbon de menores notas (G2).....	54
4.2.2.1.3	Mundo Novo (G4) x Bourbon de notas variáveis (G3).....	55
4.2.2.2	Análises entre Bourbons	58
4.2.2.2.1	Bourbon de notas variáveis (G3) x Bourbon de notas altas (G1)	58
4.2.2.2.2	Bourbon de notas variáveis (G3) e Bourbon de notas baixas (G2)	60
4.2.2.2.3	Bourbon de melhores notas (G1) x Bourbon de notas baixas (G2)	61
4.2.3	<i>Spots</i> candidatos mais relevantes	65
4.3	ANÁLISES COMPARATIVAS DOS CAFÉS CULTIVADOS EM SÃO SEBASTIÃO DA GRAMA E EM LAVRAS	66

4.3.1	Bourbon de notas altas (G1) cultivado em Lavras e em São Sebastião do Grama	66
4.3.2	Bourbon de notas baixas (G2) cultivado em Lavras e São Sebastião da Grama	68
4.3.3	Bourbon de notas variáveis (G3) cultivado em Lavras e em São Sebastião do Grama	69
4.3.4	Mundo Novo (G4) cultivado em Lavras e Sebastião da Grama.....	71
6	CONCLUSÃO	76
	REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

Enquanto alguns países do mundo são conhecidos por produzirem cafés diferenciados, classificados como especiais, no Brasil, a maior parte da produção de cafés é *commodity*. Para atender as demandas do mercado, os produtores têm procurado cada vez mais fornecer cafés de melhor qualidade ou especiais.

Vários fatores afetam a qualidade da bebida, como por exemplo, ambientais, genéticos, colheita, pós-colheita e armazenamento (LOPES, 2000).

A variedade Bourbon tem se destacado como uma ótima opção para a produção de cafés especiais (FAZUOLI et al., 2007). No entanto, encontram-se cultivados diversos genótipos denominados Bourbon em diferentes ambientes, resultando em padrões diversificados de qualidade de bebida. Até o momento, não se sabe qual a combinação ideal entre os genótipos de Bourbon existentes em diferentes ambientes para que tenha a expressão máxima de qualidade. Acredita-se que tal correlação seja possível, identificando assim, o genótipo de Bourbon mais adequado para cada ambiente.

Para investigar essa interação, diversas ferramentas estão disponíveis. Dentre elas, a proteômica apresenta-se como promissora já que possibilita a análise do conjunto de proteínas expressas num determinado tecido e momento fisiológico, gerando subsídios para investigações de processos bioquímicos e possíveis funções das proteínas no metabolismo que envolve o sabor e aroma dos grãos de café (DI CIERO; BELLATO, 2002).

As proteínas contribuem significativamente na qualidade da bebida de várias formas, como por exemplo, durante a torrefação, interações entre açúcares redutores e o grupamento amino de aminoácidos, peptídeos ou mesmo de proteínas durante a reação de Maillard, são tidas como essenciais nos processos envolvidos no desenvolvimento do sabor e do aroma (REINECCIUS, 1995). Essas participam de outras maneiras também, como por exemplo, atuando na

forma de enzimas, desencadeando transformações cruciais no grão (AMORIM, 1987).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi identificar o perfil proteômico diferencial de genótipos de Bourbon em dois ambientes, a fim de selecionar *spots* possivelmente influenciáveis na qualidade de bebida dos cafés analisados, além de tentar verificar uma possível interferência dos ambientes sob os perfis proteômicos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O café no Brasil

A produção comercial de café baseia-se principalmente em duas espécies da família *Rubiaceae* proximamente relacionadas, *Coffea canephora* e *Coffea arabica*. O café arábica foi descrito por Rossetti (2007) como precursor de um sabor suave, aromático, para ser bebido puro sem nenhum “blend”. Segundo o mesmo autor é a espécie mais complexa, com 44 cromossomas e só pode fazer cruzamentos com plantas da mesma espécie, o que evita casamentos negativos. A área plantada com as espécies *Coffea arabica* e *C. canephora* no país totaliza 2.351,3 mil hectares. Comparativamente à área plantada em 2011, foram acrescentados 73.148,2 hectares (referência). Em Minas Gerais está concentrada a maior área com 1.208,8 mil hectares, predominando o café arábica com 97,7%. A área total estadual representa 51,4% da área cultivada com café no País, e conseqüentemente o primeiro do *ranking* nacional (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2012).

A produção de Minas Gerais está estimada em 26.335.499 sacas de café na safra 2012, com produtividade média de 25,84 sacas de café por hectare. Em comparação com a safra anterior, a estimativa sinaliza aumento da produção cafeeira em 18,73%. Nota-se aumento de 4,69% quando se compara a produção das safras 2010 e 2012, safras de bienalidade positiva. No entanto, esse aumento não se deve basicamente à bienalidade positiva da cultura, mas também à melhora dos tratos culturais das lavouras, incentivados pela recuperação dos preços de comercialização do café. Tal crescimento só não foi maior em razão das intercorrências climáticas observadas em algumas regiões do Estado, que podem restringir o potencial produtivo das lavouras na atual safra (CONAB, 2012).

O café esteve regulado por muitos anos pelo Instituto Brasileiro do café com o objetivo de aumentar o valor total das exportações. Dessa maneira, o café de menor qualidade era misturado ao de melhor, o que o caracterizava como *commodity*, mas aumentava o volume de produto exportado (MORICOCCHI; MARTIN 1994; ZYLBERSZTAJN et al., 2001).

Com fim da regulamentação, os produtores passaram a mudar de estratégia na sua produção, de forma a acompanhar mudanças ocorridas no mercado consumidor, que ficou mais seletivo, passando a dar mais importância à questão de sustentabilidade da produção e qualidade da bebida (LEÃO; PAULA, 2010). Assim, em decorrência dessa crescente mudança na preferência do consumidor, observa-se maior busca e valorização por melhor qualidade, estando esses novos consumidores dispostos a pagarem mais pelos atributos desejados. Para o café, esses atributos podem ser tangíveis, ou seja, atributos como o sabor e o aroma da bebida, além dos parâmetros intangíveis, como produção sustentável ou com responsabilidade social (CHAGAS et al., 2009; LEÃO; PAULA, 2010). Nesse contexto, encontram-se os cafés especiais, definidos pela National Coffee Association - NCA (2008), como cafés de altíssima qualidade, plantados e cultivados de maneira peculiar num determinado local, apresentando elevado potencial de produção de aroma e sabor após a torra, estando isentos de defeitos. Segundo Souza, Saes e Otani (2002), as possibilidades de diferenciação do café, ultrapassam a qualidade final da bebida, podendo seus atributos de qualidade apresentar ampla gama de conceitos, desde características físicas, origens, variedades, cor e tamanho ou sensoriais, como corpo e aroma e até preocupações de ordem ambiental e social, como os sistemas de produção e as condições da mão de obra sob as quais o café é produzido (referência). Zylbersztajn et al. (2001) definem cafés especiais da seguinte forma:

O conceito de cafés especiais está intimamente ligado ao prazer proporcionado pela bebida. Tais cafés destacam-se por algum atributo associado ao produto, ao processo de produção ou a serviço a ele relacionado. Diferenciam-se por características como qualidade superior da bebida, aspectos dos grãos, forma de colheita, tipo de preparo, história, origem dos plantios, variedades raras e quantidades limitadas, entre outras. Podem também incluir parâmetros de diferenciação que se relacionam à sustentabilidade econômica, ambiental e social da produção.

Devido à grande concorrência mundial, o café brasileiro tem se adequadado às exigências do mercado consumidor e, com isso, diversas técnicas estão sendo utilizadas para a análise de qualidade do café (GONZALEZ-RIOS, 2007).

No Brasil foi criada a Associação Brasileira de Cafés Especiais (BSCA) que fornecem os cafés mais finos produzidos no país, que são garantidos por certificados de qualidade expedidos após controle de qualidade efetuado por especialistas e provadores da própria BSCA e de empresa especializada independente.

Dentre os cafés com potencial para a produção de especiais, destaca-se a variedade Bourbon que vem sendo amplamente utilizada para esse fim.

2.2 Qualidade do Bourbon

A variedade Bourbon pertence à espécie *Coffea arabica* L., que é um alotetrapoide, com $2n=4x=44$ cromossomos, sendo a única espécie autógama, apresentando 10% de alogamia (MENDES et al., 2002). Esse café foi introduzido no Brasil em 1859, com a chegada das sementes de Bourbon Vermelho (*C. arabica* cv Bourbon Vermelho) provindas da Ilha da Reunião, com intuito de aumentar a produtividade e a qualidade (TAUNAY, 1939). Porém mais tarde, no Estado de São Paulo foram encontrados frutos de Bourbon

de coloração amarela, um provável híbrido natural entre Bourbon Vermelho e Amarelo de Botucatu, que mais tarde o Instituto Agrônomo, num plano de melhoramento, verificou ser ainda mais produtiva que o Bourbon Vermelho (CARVALHO et al., 1994).

Fazuoli et al. (2005) caracteriza as plantas de Bourbon, como sendo vulneráveis a ferrugem, possuindo porte médio/alto, maturação precoce e frutos de coloração avermelhada ou amareladas e sementes com peneira média de 16mm. Ainda segundo o mesmo autor, seu plantio para produção de cafés especiais é indicado em regiões com altitudes acima de 1000 m. Tal característica é favorecida pela maturação precoce segundo Salvadoran Coffee Council (2009).

Mendonça et al. (2007) encontraram valores maiores de açúcares totais na variedade Bourbon Amarelo em relação a Bourbon Vermelho, podendo ser um indicativo de que a maior disponibilidade desses compostos faz com que aumente a produção de voláteis responsáveis pelo aroma da bebida, a partir da maior participação desses no processo de torra.

Figueiredo (2010) analisou sensorialmente genótipos da variedade Bourbon em três diferentes ambientes, notando variações quanto à qualidade de bebida apresentada entre os genótipos e que um mesmo genótipo pode expressar qualidades diferentes de bebida em ambientes diferentes.

2.3 Qualidade de bebida do café

Para o café, a boa qualidade da bebida é aquela que apresenta sabor e aroma agradáveis, bom corpo, acidez natural e suavidade ao paladar (BORÉM, 2004). A classificação da bebida é gerada a partir da análise sensorial, mais comumente conhecida como “prova de xícara”.

Dentre as diversas metodologias para a avaliação sensorial de cafés especiais, a mais indicada é aquela preconizada pela Associação Americana de Cafés Especiais, onde são avaliados os seguintes atributos: fragrância/aroma, sabor, acidez, corpo, sabor residual, doçura, uniformidade, xícara limpa, equilíbrio e avaliação global. Essa técnica de avaliação considera como cafés especiais, cafés que obtiveram nota igual ou superior a 80 pontos (FIGUEIREDO, 2010).

A qualidade da bebida de café é determinada pelos componentes químicos precursores de sabor e aroma que se encontram no endosperma e que dependem do processo de torração utilizado (ABRAHÃO, 2007). Os principais constituintes do grão de café e suas proporções, segundo Hoffman (2001) são: 6-12 % de proteínas, 8-11% de água, 13-20 % de lipídeos, 6-9% de ácidos clorogênicos, 1-2,5% de cafeína, 7-30% de açúcares, 3-4 de minerais, 15-20 de celulose.

O sabor e o aroma da bebida café são complexos, resultantes da presença combinada de vários constituintes químicos voláteis e não voláteis, entre eles os ácidos, aldeídos, cetonas, açúcares, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos, compostos fenólicos, incluindo também a ação de enzimas em alguns desses constituintes, dando produtos de reações, compostos que interferirão no sabor da prova de xícara. Dentre esses compostos, 29 já foram identificados como os principais responsáveis pelo aroma característico do café torrado e moído (SARRAZIN et al., 2000).

O aroma da bebida de café é formado por uma mistura extremamente complexa de inúmeros compostos voláteis que apresentam qualidades de aroma, intensidades e concentrações diferentes, sendo que cada um contribui de uma maneira diferente (MOREIRA; TRUGO; DE MARIA, 1999).

Vários fatores interferem diretamente na qualidade final da bebida alterando a composição química do grão, dentre eles, influência genética,

ambiental e cultural, além dos métodos de colheita, processamento e armazenamento (LOPES, 2000; SILVA; PEREIRA, 2004). Durante a torração, vários processos bioquímicos complexos estão relacionados à cor, sabor e aroma da bebida, dentre eles, a degradação de ácidos clorogênicos, açúcares, proteínas, entre outros (LOPES, 2000).

Contudo, existe uma grande dificuldade em relacionar a composição química do grão de café com a qualidade da bebida, devido à complexidade dos processos. Assim, fica evidente a necessidade de estudos mais aprofundados, capazes de elucidar tal ligação, selecionando rotas metabólicas e moléculas contribuintes no sabor e aroma da bebida. Nesse contexto, destacam-se as proteínas por apresentarem uma gama enorme de informações biológicas e por participarem de várias formas na formação do sabor e aroma da bebida.

2.4 Proteínas na qualidade do café

De acordo com Hofman (2007), o grão de café apresenta teor de proteínas de 6-12%. Esses polipeptídeos no grão de café estão livres no citoplasma ou ligados a polissacarídeos da parede celular, sendo desnaturadas durante a torração. O teor de proteína do café cru pode variar com a idade e variedade da planta, e também com o estágio de maturação dos frutos (PIMENTA, 1995).

A importância das proteínas na qualidade da bebida de café está relacionada à sua participação na reação de Maillard, a partir das interações estabelecidas com açúcares redutores e o grupamento amino de aminoácidos e peptídeos, sendo fundamentais no desenvolvimento do aroma e sabor da bebida. Tal reação ocorre durante a torração, e é responsável pela produção de aromas e coloração escura em diversos alimentos (HO et al., 1993 citado por ABREU, 2008).

Selmar et al. (2001) destacam que a alanina é um importante aminoácido no desenvolvimento de compostos aromáticos durante a torração de café, participando da reação de Maillard. Alanina, asparagina, ácido glutâmico, ácido aspártico e serina representam aproximadamente 80% dos aminoácidos livres em sementes de café (SHIMIZU; MAZZAFERA, 2000).

Além disso, as proteínas participam na desaminação espontânea de resíduos de asparagina e glutamina (REINECCIUS, 1995). Durante a torração do café, na presença de calor, essa desaminação leva a produção de uma molécula de amônia, que uma vez livre pode sofrer uma série de reações produzindo pirazinas responsáveis pelo aroma torrado do café. Porém em alta quantidade pode prejudicar o sabor da bebida. (HO et al., 1992; HO et al., 1993 citado por ABREU, 2008).

No que se referem às enzimas, essas têm grande importância na qualidade de bebida de café, sendo que sua atuação pode contribuir tanto para uma melhor qualidade, quanto para uma menor, dependendo da sua função e nível de expressão.

Várias transformações químicas que ocorrem no grão do café, quando o teor de água é elevado levando a uma bebida de qualidade inferior, são de natureza enzimática, uma vez que as enzimas são constituintes do próprio grão ou de microrganismos (AMORIM, 1978).

Ludwing et al. (2000), mostraram que as proteases têm papel de importância na qualidade da bebida, são específicas e agem promovendo a quebra de determinadas proteínas e liberando aminoácidos que estarão envolvidos na realocação e formação de novas proteínas relacionadas ao aroma e sabor. Tais enzimas têm ação crucial na síntese de determinadas proteínas, controlando sua forma, tamanho e destruição (SCHALLER, 2004).

A literatura tem mostrado que juntamente com as proteínas, aminoácidos e compostos fenólicos, a atividade diferencial de algumas proteases pode ter

uma relação que explique muito da variação ocorrida em plantas cultivadas em regiões diferentes, podendo estas ser influenciadas por fatores como a temperatura (SHIMIZU; MAZZAFERA, 2000; SILVA et al., 2005). A temperatura está diretamente ligada à qualidade final da bebida em plantas de diferentes regiões, já que essa pode influenciar nos níveis de expressão de proteases, modificando o perfil proteico encontrado nos frutos (SILVA et al., 2005).

Amorim e Silva (1968) mostraram correlação positiva entre a enzima polifenoloxidase e a qualidade do café, indicando que cafés de pior qualidade exibem baixa atividade enzimática da polifenoloxidase. Segundo Carvalho et al. (1994), qualquer condição adversa sofrida pelo grão, interfere na atuação da enzima sobre os polifenóis, diminuindo sua ação e facilitando sua oxidação, influenciando no sabor e aroma do café após a torra.

O estudo do perfil proteico dos genótipos de café em resposta ao ambiente e a sua atuação na qualidade de bebida, pode contribuir para a criação de um padrão do melhor genótipo a ser cultivado de acordo com as características de cada local, ou através de programas de melhoramento, obter novos genótipos capazes de expressar uma qualidade ideal de bebida. Entretanto, as proteínas representam apenas uma das moléculas que contribuem para a qualidade final da bebida.

2.5 Proteoma

Di Ciero e Bellato (2002) e Lanças et al. (2003), afirmam que o termo proteômica foi criado em 1.995 por Wilkins e Willians, com intuito de abranger todas as proteínas expressas por um genoma.

Ainda de acordo com Di Ciero e Bellato (2002), a proteômica pode ser vista como uma ferramenta da biologia molecular, que objetiva elucidar a

distribuição das proteínas na célula, identificar e caracterizar proteínas individuais de interesse e principalmente elucidar as suas associações e funções.

Na área de proteômica de café, alguns trabalhos recentes podem ser citados, como Guimarães (2007), que analisou a proteômica diferencial de *Coffea canephora* sob condições de déficit hídrico; Koshino et al. (2007) que fizeram a análise proteômica de embriões zigóticos e endosperma em sementes de *Coffea arabica*. Ramos et al. (2007) que também analisaram o estresse hídrico em cafeeiro, entre outros.

Atualmente, diversas ferramentas vêm sendo desenvolvidas para facilitar as análises proteômicas, mas de acordo com Di ciero e Bellato (2002), duas técnicas foram as mais comumente empregadas para proteômica e ainda prevalecem: eletroforese bidimensional que faz a separação, detecção e quantificação das proteínas, e espectrometria de massa, responsável pela identificação dessas com auxílio eficaz da bioinformática.

A eletroforese bidimensional é um método de separação eficiente porque todas as proteínas em uma amostra são separadas simultaneamente fornecendo informações úteis sobre ponto isoelétrico, massa molecular, expressão, abundância relativa e modificações pós-traducionais, verificadas pela alteração da mobilidade eletroforética (PANDEY; MANN, 2000).

Segundo Rocha et al. (2005), o princípio das técnicas de eletroforese está baseado no movimento migratório de moléculas, entre elas as proteínas, sob a influência de um campo elétrico ao qual determina a velocidade da migração, sendo essa influência também, pela carga, tamanho, força iônica da proteínas e da viscosidade e temperatura do meio de separação.

De acordo com Silva e Silva, Corrêa e Reis (2007), a eletroforese bidimensional consiste em duas etapas de separação, sendo essas criadas de acordo com propriedades das proteínas. Na primeira etapa, denominada primeira dimensão, as proteínas são separadas em um gel de poliacrilamida com gradiente

de pH de acordo com sua carga elétrica. Nesse caso, quando submetidas a um campo elétrico, as proteínas migram sob uma tira de gel (Immobilized pH Gel – IPG), até que atinjam seu ponto isoelétrico, ponto onde suas cargas ficam neutras, interrompendo a migração sendo também denominada focalização isoelétrica (IEF). Na segunda etapa, chamada segunda dimensão, as proteínas que já foram separadas por IEF, agora são separadas de acordo com sua massa sendo submetidas a uma eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida.

2.6 Fatores que afetam a composição química do grão

Dentre os fatores que afetam a composição química do grão, alguns são destaque, como ambientais, genéticos, tratos colheita e pós-colheita.

2.6.1 Ambiente

Segundo a National Coffee Association - NCA (2008), as condições geográficas ideais para plantio de cafés de qualidades elevadas são alta altitude, como já foi mencionado, além de solo fértil. Dessa forma, são regiões localizadas ao redor da zona equatorial, onde durante o dia as temperaturas são elevadas e, à noite, baixas, sendo fatores determinadas no que diz respeito à qualidade da bebida.

Camargo, Santinato e Cortez (1992), afirmam que as temperaturas ideais para a cultura de café arábica, variam entre 18 a 22° e deficiências hídricas inferiores a 150 mm anuais. Ainda segundo o mesmo autor, a diferença quanto à qualidade da bebida entre as regiões, ocorre porque onde são cultivados cafés de bebidas inferiores, as condições do clima, de colheita e de processamento do fruto propiciam maior aparecimento de microrganismos, causando a deterioração dos grãos.

Cortez (1997) afirma que em regiões de clima mais quente e/ou úmido no período da colheita, o ciclo de maturação é mais curto, fazendo com que os frutos no estágio cereja passem para passa de forma mais acelerada, havendo grande risco da fermentação inicial dos frutos (acética e láctica) evoluir rapidamente para as fases seguintes (propionica e láctica), que afetam a qualidade da bebida de forma prejudicial.

O estágio cereja é o momento onde o fruto se apresenta no seu grau máximo de maturação, com sua composição química completamente desenvolvida, o que lhe permite expressar todo seu potencial de qualidade da bebida (FAVARIN et al., 2004).

Em algumas regiões cafeeiras do Estado de São Paulo, as temperaturas mais elevadas reduzem os ciclos entre florada e a maturação de grãos, especialmente na fase final do ciclo. Essa condição afeta a translocação de compostos fenólicos do interior do endosperma para as camadas superficiais, impedindo uma coincidência entre a migração total desses compostos e o ponto ideal de colheita. Isso confere um caráter adstringente e metálico, dando origem à classificação de bebida dura. As mesmas considerações são encontradas para a transformação do triptofano em serotonina. Em altitudes mais elevadas, com temperaturas mais amenas, a transformação ocorre de forma completa, assim como a translocação de compostos fenólicos, condição essencial para a classe da bebida Mole (ORTOLANI et al., 2000).

Decazy et al. (2003) ao estudarem a qualidade da bebida de café, em diferentes ambientes em Honduras, mostraram que altas altitudes e baixo índice pluviométrico, interferem de forma favorável na qualidade da bebida, produzindo grãos maiores e com maior quantidade de lipídeos.

Silva e Pereira (2004), em seu trabalho também estudaram a influência da altitude nas propriedades sensoriais da bebida do café em amostras colhidas

em regiões com variações de altitude de 720 a 1120m, mostraram que maiores altitudes, possibilitam a produção de cafés de melhor qualidade.

Segundo Fazuoli et al. (2007), o plantio da cultivar Bourbon Amarelo para a produção de cafés especiais só seria indicada em regiões de maiores altitudes e temperaturas mais baixas, garantindo a melhor distribuição de maturação dos frutos e obtendo melhor qualidade.

2.6.2 Genótipo

De um modo geral a qualidade da bebida em *C. arabica* é considerada muito boa, sendo as cultivares Típica, Bourbon Vermelho e Bourbon Amarelo consideradas excelentes no que se refere à qualidade da bebida (FAZUOLI et al., 2007).

Lopes (2000) ao avaliarem a qualidade de grãos de café de diferentes cultivares de *Coffea arabica* L. , concluíram que a qualidade de bebida de diferentes cultivares poderá variar em função das diferenças entre os componentes químicos do grão e, contudo, sofrer efeito das condições ambientais, tratos culturais, colheita e processamento aos quais são submetidos.

Mendonça et al. (2007) em seu trabalho analisou 16 cultivares de café, dentre elas a cultivar Bourbon Amarelo, concluindo que as cultivares avaliadas possui diferenças na composição química do grão cru, sendo possível inferir a existência de influência do genótipo sobre tais características.

Lopes (2000) avaliou alguns constituintes químicos dos grãos crus de uma mistura de frutos de oito cultivares de *C. arabica* L. e observou variações significativas nos teores de sólidos solúveis, extrato etéreo, açúcares e proteína bruta.

Fazuoli et al. (2007), indicam para a produção de cafés especiais, as cultivares Bourbon Amarelo, Bourbon Vermelho e Icatu precoce e ainda afirma

que a excelente qualidade da bebida de cultivares que são 100% arábica ou tipo arábica desenvolvidos no Instituto Agronômico de Campinas, é devido a participação do Bourbon na formação das mesmas.

2.6.3 Colheita e pós-colheita

Os processos de colheita e pós-colheita também são capazes de influenciar na composição química final do grão de café (BORÉM, 2008).

2.6.3.1 Colheita seletiva

Segundo Borém (2008), para a produção de cafés de alta qualidade, a colheita seletiva é a mais indicada, já que nesse caso, resultará numa uniformidade dos frutos, sendo em sua totalidade maduros.

2.6.3.2 Lavagem e separação hidráulica

Previamente à lavagem, ocorre a abanação, onde impurezas leves como folhas e gravetos são retirados. Em seguida, é feita a separação hidráulica dos frutos por diferença de densidade, formando um lote de frutos cereja e verde, que são mais densos, e outro, formado pelos frutos boia. Essa etapa também permite a retirada de impurezas que não foram removidas anteriormente (BORÉM, 2008).

2.6.3.3 Preparo por via seca e via úmida

De acordo com Borém (2008), a via úmida pode resultar em três formas distintas de processamento: café despulpado, café cereja descascado e café desmucilado e as etapas ocorridas nesse processo geralmente acarretam na formação de cafés com bebidas de qualidade superior.

Taveira (2009) afirma que o tipo de processamento e secagem pode afetar enzimas e proteínas essenciais na preservação da qualidade, englobando a fase de germinação e também de manutenção e regeneração dos tecidos dos grãos.

2.6.3.4 Secagem

A secagem faz-se necessária, pois no momento da colheita, há uma alta umidade, gerando condições favoráveis para deteriorações, devido à respiração, oxidações, fermentações e ocorrências de fungos e bactérias.

Segundo Borém (2008), altas temperaturas e taxas de secagem estão entre os fatores principais causadores de perda de qualidade do café durante a pós-colheita, afirmando que a secagem ideal acontece de forma que a água seja removida vagarosamente, evitando processos fermentativos.

De acordo com Afonso Júnior e Corrêa (2003) temperaturas mais elevadas do ar de secagem, pode ter como consequência, danos nas membranas celulares ou desorganização dos componentes celulares, desnaturação de proteinase, entre outras, causando o decréscimo da qualidade.

Livramento (2008) analisou o perfil proteômico de cafés natural e despulpado, submetidos a dois processos de secagem, sendo eles, secagem ao sol em terreiros e secagem com ar aquecido a 60° C. O autor observou que os cafés despulpados apresentaram quantidade maior de *spots*, isto é, pontos proteicos nos géis em relação ao café natural, concluindo que além do tipo de processamento, a temperatura do ar pode ter contribuído para a diminuição de *spots* no café natural.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização das amostras

Este estudo foi feito com base na pesquisa realizada por Figueiredo (2010) que analisou sensorialmente amostras de cafés das safras 2009 e 2010 de 14 genótipos cultivados em três diferentes locais: São Sebastião da Grama, SP; Lavras, MG e em Santo Antonio do Amparo, MG. Essas regiões foram escolhidas por serem polos produtores de café, por serem produtoras da variedade Bourbon, bem como por apresentarem características edafoclimáticas distintas.

Desses 14 genótipos foram selecionados três Bourbons Amarelo tomando-se como base aqueles que nas três regiões obtivera: notas altas (G1), notas baixas (G2) e notas variáveis (G3) (Quadro 1). A variedade Mundo Novo, por ser um café amplamente comercializado no país foi escolhido como testemunha. Entretanto, as análises proteômicas foram realizadas apenas com os frutos cultivado na cidade de São Sebastião da Grama e Lavras.

Quadro 1 Média de notas da análise sensorial dos cafés colhidos nas safras de 2009 e 2010

Denominação	Genótipo	Notas sensoriais	
		São Sebastião do Grama	Lavras
G1	Bourbon Amarelo	81,23	82,13
G2	Bourbon Amarelo	78,90	79,58
G3	Bourbon Amarelo LCJ9	80,98	79,98
G4	Mundo Novo IAC 502/9	82,01	79,22

Fonte: Figueiredo (2010)

3.2 Caracterização das regiões de cultivo

A cidade de São Sebastião da Gramma está localizada na região mogiana do Estado de São Paulo a uma altitude de 1300 metros, com solo classificado como Latossolo Amarelo de textura média. A região teve sua temperatura do ar e precipitação monitorados durante o experimento, apresentando uma temperatura média anual de 20°C e precipitação média anual de 1560 mm.

Lavras está localizada na região Sul do Estado de Minas Gerais, a uma altitude de 950 metros, com solo classificado como Latossolo Vermelho de textura argilosa. A região teve sua temperatura do ar e precipitação monitorados durante o experimento, apresentando uma temperatura média anual de 20,4°C e precipitação média anual de 1460 mm.

3.3 Coleta, processamento e armazenamento dos frutos

Os frutos submetidos à análise proteômica foram colhidos na safra de 2010 por Figueiredo (2010). A colheita foi realizada de forma manual e seletiva, quando a maioria dos frutos de cada parcela atingiu o estado de maturação cereja. Em seguida, foi feita a separação hidráulica dos frutos por diferença de densidade. Posteriormente, nova separação manual foi realizada na porção de frutos cerejas garantindo-se apenas a presença de frutos maduros. Cerca de 20L de frutos cereja, foram descascados, originando o café cereja descascado (CD). Em seguida, as amostras foram secadas em peneiras, com moldura de madeira e tela com malha de 2,00 x 1,00 mm, fabricadas em fios de polietileno, de 1m², dispostas sobre terreiro pavimentado. Cada peneira recebeu 7L de café descascados. As amostras foram resolvidas vinte vezes ao dia. Na primeira noite, a tela foi mantida descoberta, e nas noites seguintes, coberta com pano. A espessura da camada, equivalente a 7 L m⁻², foi mantida até o café atingir a meia

seca, com teor de água de, aproximadamente, 25% (b.u). Em seguida, dobrou-se a espessura da camada de café. Tais procedimentos foram realizados até o café atingir teor de água de 11% (b.u). Todos os procedimentos de colheita e processamento foram realizados segundo Borém (2008).

Após a secagem, as amostras foram embaladas em sacos de papel, revestidos com polietileno, e mantidas em câmara com temperatura controlada, abaixo de 15°C e Umidade Relativa controlada em 60%, por um período de 60 dias. Concluído esse período, as amostras foram beneficiadas. Em seguida, tanto os grãos mocas como todos os defeitos foram retirados, permanecendo somente os grãos chatos separados em peneiras com crivos circulares de 19 a 16/64 avos de polegada.

Posteriormente, as amostras, foram congeladas a -80° C até serem submetidas às análises proteômicas.

3.4 Análise proteômica

Cada análise foi feita em triplicata para garantia total dos resultados obtidos, atingindo então um total de 12 análises para cada colheita.

Para a extração das proteínas totais os grãos foram submetidos à maceração com nitrogênio líquido, com auxílio de graal e pistilo de porcelana. As proteínas foram extraídas de 200-300mg do pulverizado com 660µl de tampão de lise contendo 7M ureia, 2M tiureia, 14mM de trizma base (GE Lifesciences), 100µl do coquetel de inibidores de proteases (GE Lifesciences), 12 unidades de DNaseI (1mg/ml), 20µl de RNase A (1mg/ml), 0,2% (v/v) Triton X-100, 60mM CHAPS (GE Lifesciences) e 17,5Mm DTT (GE Lifesciences). A mistura foi homogeneizada em vortex e colocada em gelo. Após quinze minutos, os tubos foram centrifugados a 17,5xg, por dez minutos, a 4°C. O sobrenadante

com as proteínas totais foi novamente centrifugado e estocado a -20°C , em alíquotas de $100\mu\text{l}$.

As amostras de proteínas foram quantificadas por densidade ótica, de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão, pelo espectrofotômetro Gene Quant (GE Lifesciences).

Para análise da integridade foram escolhidas ao acaso, dez amostras de proteínas totais extraídas que foram visualizadas em gel de poliacrilamida 12% (m/v), com intuito de observar a integridade das mesmas e a eficiência do método de extração. A separação das proteínas foi feita por eletroforese, realizada pelo sistema miniVE (GE Lifesciences), a 100V, 400mA e 50W, durante uma hora e quarenta minutos.

A eletroforese bidimensional foi feita no Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, utilizando o sistema *Multiphor II* (GE Lifesciences). Nessa análise, as proteínas foram separadas por focalização isoeletrica, utilizando-se 18 cm de fita com pH imobilizado, entre 3-10 (*Immobiline Drystrips* - GE Lifesciences). As fitas para focalização isoeletrica foram reidratadas no suporte de reidratação individual em canaletas (*Reswelling Tray GE Lifesciences*) por 15 horas, a temperatura ambiente, em tampão tiureia/ureia, contendo 7M ureia, 2M de tiureia, 1% (v/v) *IPG Buffer* (GE Lifesciences), 2% CHAPS (p/v), 1,8mM DDT e azul de Bromofenol. Nas canaletas foi aplicado o volume final de $340\mu\text{l}$ de tampão contendo $230\mu\text{g}$ de proteínas. Após posicionar as fitas nas canaletas, 2,0ml de *Cover Fluid* (GE Lifesciences) foram aplicados sobre cada fita. A focalização isoeletrica ocorreu a 15°C , a 150V, por um minuto; 150V por três horas; 500V por três horas; 3500V por cinco horas; e 3500V por doze horas, atingindo um total de 55KVh. Ao final da focalização, as fitas foram armazenadas em tubos de vidro estéreis, a -80°C , até o início da eletroforese de segunda dimensão.

Previamente a eletroforese de segunda dimensão, as fitas foram equilibradas em solução contendo 6M ureia, 29% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS, 75mM Tris-HCl 1,5M, pH 8,8, 0,002 (p/v) azul de bromofenol 1%, com 65mM DDT, referente ao primeiro passo, e no segundo passo, com 0,2M iodoacetamina, sem o uso de DTT. Cada passo teve duração de 30 minutos sob agitação. Cada fita foi uma a uma, colocada sobre o gel de poliacrilamida 12,5% homogêneo (GE Lifesciences), ao lado do tampão sólido (*Buffer* - GE Lifesciences), na extremidade negativa da cuba. A eletroforese de segunda dimensão ocorreu a 15°C, a 600V, 20mA, 30W, durante 35 minutos e a 600V, 50mA, 30W por uma 1 hora e 40 minutos ou até que o marcador de corrida atingisse o tampão sólido na extremidade positiva.

Para coloração dos géis, esses foram inicialmente colocados por trinta minutos em uma solução de fixação contendo 7% (v/v) de ácido acético, 40% (v/v) metanol e, em seguida, transferidos para a solução de coloração contendo quatro partes de solução com 0,1% (p/v) de azul de Comassie G-250, 2% (v/v) ácido fosfórico e 15% (p/v) sulfato de amônio mais uma parte de metanol, submetidos à agitação por 48 horas. Posteriormente, foram neutralizados por 3 minutos com solução contendo 1,2% (p/v) Tris-Base e pH 6,5 aferido com ácido fosfórico. Em seguida, lavados com solução contendo 25% (v/v) de metanol e armazenados em solução contendo 20% (p/v) de sulfato de amônio.

Os géis corados tiveram suas imagens digitalizadas em scanner de alta resolução (*ImageScanner*, GE Lifesciences) equipado com o programa *Ulmax MagicScan* 4.6, em modo transmissivo, com 300dpi. As análises das imagens foram feitas através do programa *ImageMaster 2D Platinum* 5.0 (GE Lifesciences). Para a detecção dos *spots*, os géis foram alinhados e agrupados, para a determinação dos volumes de cada *spot*. Em seguida, foram feitas as análises dos grupos, classes e teste estatístico (Teste T de *Student*). Dessa forma, foram realizadas três análises: na primeira, todos os genótipos cultivados na

cidade de São Sebastião da Gramma, foram comparados entre si, dois a dois, num total de seis análises, fazendo uma análise do perfil diferencial dos genótipos cultivados num mesmo ambiente. Na segunda, foram feitas as mesmas análises, porém, com os genótipos cultivados na cidade de Lavras. E na terceira, cada genótipo foi comparado consigo mesmo, porém, obtidos de ambientes diferentes, Lavras e São Sebastião da Gramma. Foram considerados como um ponto de proteína diferencialmente expressa, *spots* com alteração na expressão de pelo menos, 2X e um resultado significativo no teste T de *Student* ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram subdivididos de acordo com as análises, num total de três: análises de cafés cultivados em São Sebastião da Grama, análises de cafés cultivados em São Sebastião da Grama e análises entre os dois ambientes.

4.1 Análises de cafés cultivados em São Sebastião do Grama

As análises proteômicas realizadas a partir de cafés cultivados somente em São Sebastião da Grama estão descritas abaixo.

4.1.1 Análise dos géis

Em geral, foi encontrada uma média de 89 *spots* nas amostras analisadas. Os géis não apresentaram variação grande com relação ao número de *spots* (Figura 1), sendo o gel correspondente ao café Bourbon de notas variáveis (G3), o que apresentou maior número, em média 91 *spots* seguido pela testemunha Mundo Novo, com média de 90 e por fim, o Bourbon de melhores notas (G1) e o Bourbon de notas mais baixas (G2), com média de 89 *spots*. Tais resultados ainda não permitem estabelecer relação entre o número de *spots* e a qualidade da bebida. Livramento (2008) ao analisar cafés também secados em terreiro encontrou média de 360 *spots* e 252, respectivamente, para café descascado e natural. No entanto, deve-se considerar que nesse caso vários outros fatores podem ter influenciado, tais como formas de processamento, outro genótipo, além de diferentes ambientes.

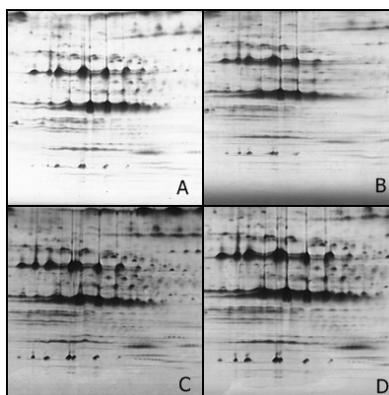


Figura 1 Géis bidimensionais referentes ao: (A) café de melhor qualidade sensorial – G1, (B) café de menor qualidade – G2, (C) café de qualidade variável – G3 de acordo com o ambiente de cultivo e (D) testemunha – G4

4.1.2 Análises comparativas

Primeiramente foram feitas as análises comparativas entre a testemunha e os Bourbons e depois, somente entre os Bourbons, como descrito abaixo.

4.1.2.1 Testemunha (Mundo Novo) x Bourbons

Foram encontrados diversos pontos proteicos diferencialmente expressos entre a testemunha e os genótipos de Bourbon.

4.1.2.1.1 Mundo Novo (G4) x Bourbon de maiores notas (G1)

Após a comparação dos *spots* por diferença de porcentagem de volume, foram encontrados também, oito *spots* com diferenças quantitativas variando de 2X até 17X (Tabela 1).

Tabela 1 Volume relativo dos *spots* das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e resultado significativo no teste *t-student* ($p < 0,05$)

SPOT	Volume relativo dos <i>spots</i>		Variação relativa
	Mundo Novo (G4)	Bourbon de maiores notas (G1)	
1386	0,25	0,52 ++	2,08 X
2157	0,23	0,67 ++	2,91 X
1149	0,02	0,07 ++	3,50 X
944	0,06	0,14 ++	2,33 X
1148	0,08	0,16 ++	2,00X
715	0,11	0,35 ++	3,18 X
722	0,03	0,16 ++	5,33 X
2189	0,01	0,17 ++	17,00 X

Os valores representam as médias da porcentagem de volume das proteínas em triplicatas.

Em todos os *spots* houve abundância proteica maior no tratamento G1 em relação à testemunha (Figura 2). Os *spots* que mais se destacam quantitativamente foram 722 e 2189, apresentando variações proteicas de 5,33X e 17X, respectivamente. Nota-se que o *spot* 2189 é quase inexistente na testemunha, podendo ser esse um potencial marcador da expressão genotípica.

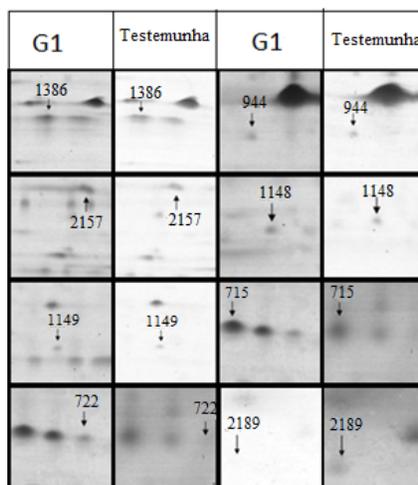


Figura 2 Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os sete *spots* com diferença de abundância proteica significativa

4.1.2.1.2 Mundo Novo (G4) x Bourbon de notas mais baixas (G2)

Após a comparação dos *spots* por diferença de porcentagem de volume, foram encontrados apenas dois *spots* com diferenças quantitativas de 2,54X e 11X (Tabela 2).

Tabela 2 Volume relativo dos *spots* das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e resultado significativo no teste t-*student* ($p < 0,05$)

SPOT	Volume relativo dos <i>spots</i>		Variação relativa
	Mundo Novo (G4)	Bourbon de notas mais baixas (G2)	
715	0,11	0,28 ++	2,54 X
2189	0,1	0,11++	11,00 X

Os valores representam as médias da porcentagem de volume das proteínas em triplicatas.

Nessa análise, os dois pontos proteicos com diferenças de abundância, foram mais expressos em G2 (Figura 3), particularmente o 2189.

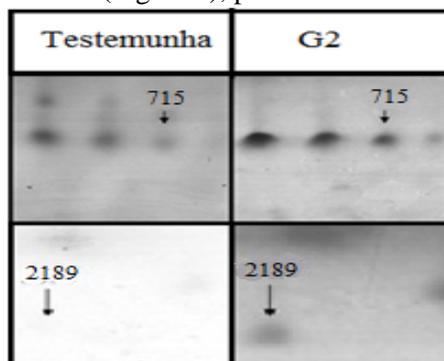


Figura 3 Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os dois *spots* com diferença de abundância proteica significativa

4.1.2.1.3 Mundo Novo (G4) x Bourbon de notas variáveis (G3)

Após o alinhamento, 71,6% dos *spots* formaram grupos e a partir da análise por porcentagem de volume, foi possível a identificação de oito *spots*

que apresentaram variação diferencial entre 2,74X e 5,42X (Tabela 3). De todos esses *spots*, sete apresentaram abundância proteica maior na testemunha Mundo Novo em relação ao G3 (Figura 4), a exceção do 715.

Tabela 3 Volume relativo dos *spots* das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e resultado significativo no teste *t-student* ($p < 0,05$)

SPOT	Volume relativo dos <i>spots</i>		Variação relativa
	Mundo Novo (G4)	Bourbon de notas variáveis (G3)	
1300	0,74 ++	0,27	2,74 X
1487	0,12 ++	0,04	3,00 X
621	0,40 ++	0,14	2,85 X
619	0,44 ++	0,13	3,38 X
1304	0,29 ++	0,09	3,2 X
715	0,11	0,39 ++	3,54 X
867	0,42 ++	0,08	5,25 X
2152	0,38 ++	0,07	5,42 X

Os valores representam as médias da porcentagem de volume das proteínas em três triplicatas.

Os pontos proteicos que mais se destacam quantitativamente nesse caso foram 867 e 2152, com aumento na quantidade de proteínas de 5,25X e 5,42X em relação à testemunha, respectivamente.

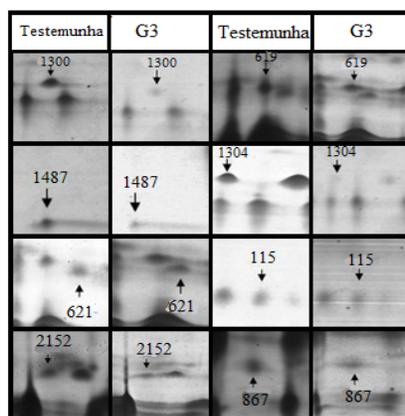


Figura 4 Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os oito *spots* com diferença de abundância proteica significativa

Comparando à testemunha Mundo Novo com os três genótipos de Bourbon, o único *spot* que apresentou diferenças quantitativas nas três análises, foi o 715, sendo sempre mais expresso nos Bourbons que no Mundo Novo. Outro *spot* que merece destaque é o 2189 que se apresenta mais expresso nos genótipos de melhor (G1) e pior qualidade (G2) em relação à testemunha. Como este *spot* encontra-se em maior expressão nos genótipos de alta e baixa qualidade, é provável que não exista uma relação entre esse *spot* e a qualidade. Outro ponto interessante, é que dentre todos os *spots* aqui considerados diferencialmente expressos esses apresentam-se com maior abundância proteica nos genótipos de Bourbons (G1 e G2) quando comparados ao Mundo Novo, No G3 apenas o *spot* 715, num total de oito apresenta-se com uma maior abundância proteica no genótipo de Bourbon. Essa maior expressão numérica nos Bourbons pode estar relacionada ao potencial desse genótipo para produção de melhor bebida, relativamente ao Mundo Novo.

4.1.2.2 Análise entre Bourbons

Foram encontrados diversos pontos protéicos diferencialmente expressos entre os genótipos de Bourbon.

4.1.2.2.1 Bourbon de notas variáveis (G3) x Bourbon de notas mais altas (G1)

Após a comparação dos *spots* por diferença de porcentagem de volume, foram encontrados 10 *spots* com diferenças quantitativas variando de 2,08 X até 7,12X (Tabela 4).

Tabela 4 Volume relativo dos *spots* das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e resultado significativo no teste *t-student* ($p < 0,05$)

SPOT	Volume relativo dos <i>spots</i>		Variação relativa
	Bourbon de notas variáveis (G3)	Bourbon de notas mais altas (G1)	
2189	0,04	0,11 ++	2,75 X
1300	0,27	0,94 ++	3,48 X
1197	0,03	0,18 ++	6,00 X
816	0,40	1,12 ++	2,8 X
1386	0,25	0,52 ++	2,08 X
1487	0,04	0,17 ++	4,25 X
1354	0,35	0,88 ++	2,51 X
619	0,13	0,59 ++	4,53 X
867	0,08	0,57++	7,12 X
1369	0,53	1,11 ++	2,09 X

Os valores representam as médias da porcentagem de volume das proteínas em triplicatas.

Nessa análise, os 10 *spots* diferencialmente expressos apresentaram uma abundância proteica maior no tratamento G1 em relação ao G3 (Figura 5). Destacando-se o spot 867, com maior diferença proteica.

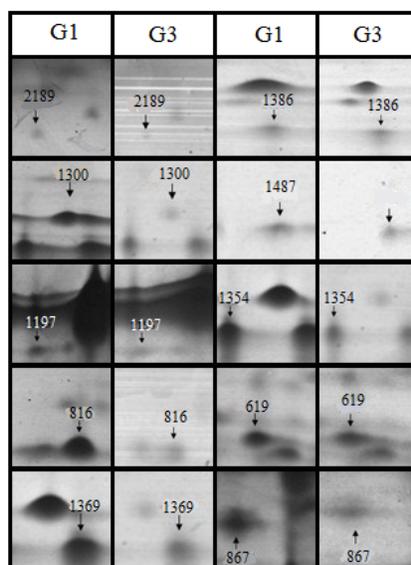


Figura 5 Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os 10 *spots* com diferença de abundância proteica significativa

4.1.2.2 Bourbon de notas variáveis (G3) e Bourbon de notas mais baixas (G2)

Após a comparação dos *spots* por percentagem de volume, foram encontrados seis *spots* apresentando diferenças quantitativas (Tabela 5).

Tabela 5 Volume relativo dos *spots* das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e resultado significativo no teste *t-student* ($p < 0,05$)

SPOT	Volume relativo dos <i>spots</i>		Variação relativa
	Bourbon de notas variáveis (G3)	Bourbon de notas mais baixas (G2)	
872	0,20	0,43 ++	2,15 X
1622	0,16	0,41 ++	2,56 X
619	0,13	0,46 ++	3,53 X
621	0,14	0,36 ++	2,57 X
867	0,08	0,34 ++	4,25 X
2152	0,07	0,51 ++	7,28 X

Os valores representam as médias da percentagem de volume das proteínas em triplicatas.

Os *spots* 867 e 2152 destacam-se por apresentarem uma maior diferença na quantidade proteica, 4,25X e 7,28 X respectivamente. No geral, todos os *spots* diferencialmente expressos apresentaram maior abundância proteica no tratamento G2 em relação ao G3 (Figura 6).

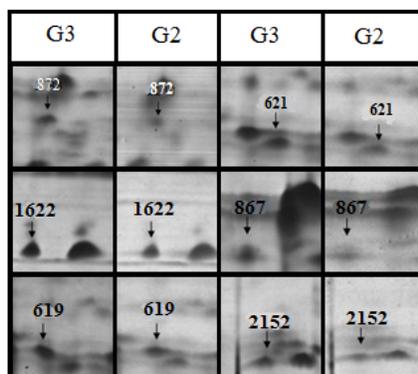


Figura 6 Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os seis *spots* com diferença de abundância proteica significativa

Fazendo uma comparação geral, do genótipo Bourbon de notas variáveis (G3), com os demais, observa-se que os pontos proteicos de G3 apresentam sempre em menor abundância. Dois pontos proteicos apresentaram diferenças de expressão em todos os casos, *spot* 867 e 619. Uma vez que a maior abundância ocorreu entre genótipos de notas altas e baixas, não é possível relacioná-la com a qualidade.

4.1.2.2.3 Bourbon de melhores notas (G1) x Bourbon de menores notas (G2)

Foram encontrados quatro *spots* apresentando diferenças quantitativas em relação à porcentagem de volume (Tabela 6).

Tabela 6 Volume relativo dos *spots* das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e resultado significativo no teste *t-student* ($p < 0,05$)

SPOT	Volume relativo dos <i>spots</i>		Variação relativa
	Bourbon de melhores notas (G1)	Bourbon de menores notas (G2)	
722	0,20 ++	0,08	2,50 X
1149	0,06 ++	0,02	3,00 X
1487	0,17 ++	0,05	3,40 X
1042	0,17 ++	0,08	2,12 X

Os valores representam as médias da porcentagem de volume das proteínas em triplicatas.

Nessa análise também, todos os *spots* diferencialmente expressos apresentaram abundância proteica maior no tratamento G1 em relação ao G2 (Figura 7).

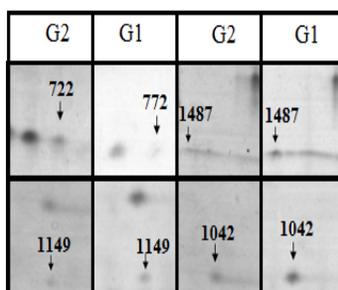


Figura 7 Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os quatro *spots* com diferença de abundância proteica significativa

De maneira geral, o genótipo de menores notas (G2) quando comparado aos demais, não apresentou nenhum ponto proteico diferencialmente expresso em comum nas três comparações. Entretanto, os pontos proteicos foram mais e menos abundantes em G2 comparativamente a G3 e G1, respectivamente. Esses resultados podem indicar que a abundância dos quatro *spots* em G1, que recebeu notas mais altas, tenham alguma relação com a qualidade. Alternativamente, pode-se inferir que a pouca expressão desses peptídeos no G2, de notas mais baixas esteja corroborando para a ausência de expressão de sua qualidade. Da

mesma forma, quando se faz a análise do Bourbon de notas mais altas (G1) em relação aos demais genótipos, todos os *spots* com diferenças significativas na quantidade proteica apresentam maior abundância nesse genótipo em relação aos outros. A maior expressão dos *spots* em G1 pode estar associada à melhor qualidade da bebida apresentada por este genótipo.

Nenhum *spot* em comum nas três análises foi encontrado, porém alguns *spots* foram diferencialmente expressos em duas análises, como o *spot* 1386 que foi encontrado quando G1 foi comparado à testemunha (G4) e quando comparado ao café de notas variáveis (G3), sendo sempre mais expresso em G1, portanto o *spot* pode estar correlacionado ao aumento de notas na análise sensorial.

Os *spots* 1149 e 722 foram diferencialmente expressos quando G1 foi comparado a G2 e a G4. Em ambas as comparações, a maior expressão se deu em G1, indicando que talvez exista uma relação desses com a melhor qualidade de bebida, já que G1 apresenta notas altas. Entretanto G4 em São Sebastião do Gramma teve uma nota superior a G1 mostrando com isso que talvez, o nível de expressão dos *spots* em G4 seja mais adequado. Essa mesma explicação cabe ao *spot* 2189 que mostrou diferenças de expressão quando G1 foi comparado a G3 e G4.

4.1.3 *Spots* mais relevantes

Nesse experimento, alguns pontos proteicos se destacaram por apresentar maiores evidências de influência na qualidade da bebida. Como por exemplo, o *spot* 715. Esse mostrou-se com diferença de expressão significativa em todas as análises onde os Bourbons foram comparados à testemunha. Para esse *spot*, os Bourbons apresentaram maior expressão em relação à testemunha, podendo ser um *spot* responsivo pela Bourbon.

Outro *spot* que pode estar influenciando na qualidade da bebida é o 1487, que foi diferencialmente expresso em três comparações simultaneamente (G2 x G1, G3 x G1 e G3 x G4), nas duas primeiras comparações a maior expressão desse *spot* foi no café de notas altas (G1). Já na comparação G3 x G4, a maior expressão foi na testemunha G4, que na análise sensorial de São Sebastião do Grama apresentou notas ainda maiores que G1. Esses resultados indicam que a maior expressão do *spot* 1487, pode estar associada a uma melhor qualidade de bebida do café.

Os *spots* 1149 e 722 podem ser também indicativos de melhor qualidade, pois foram encontrados em duas comparações envolvendo o café de notas altas (G1), quando comparado ao café de notas baixas (G2) e a testemunha (G4), sendo a maior abundância proteica encontrada em G1 nos dois casos. Entretanto, o G4 na análise sensorial da cidade de São Sebastião da Grama, obteve uma nota superior a G1, mostrando que o nível de expressão diminuído em relação a G1 talvez seja melhor para a qualidade.

O *spot* 2189 se destaca pelo mesmo motivo dos *spots* anteriormente citados, entretanto ele se repete nas comparações: G1 x G4 e G3 x G4, prevalecendo a maior abundância em G1 no primeiro caso e em G4 no segundo, ambos possuem notas mais altas na análise de São Sebastião da Grama.

Estudos posteriores são necessários para a identificação dos pontos proteicos aqui destacados e dos demais que mostraram diferenças de expressão, podendo confirmar ou não, a relação desses com a qualidade de bebida.

4.2 Análises de cafés cultivados em Lavras

As análises proteômicas realizadas a partir dos cafés cultivados somente em Lavras são descritas abaixo.

4.2.1 Análise dos géis

Em geral, foi encontrada uma média de 114 *spots* nas amostras analisadas. Os géis não apresentaram variação grande com relação ao número de *spots* (Figura 8), sendo o gel correspondente ao café de notas variáveis (G3), o que apresentou menor número, em média 106 *spots*, seguido pelo Bourbon de notas baixas, com média de 110, Bourbon de notas altas (G1), média de 117 e por fim, Mundo Novo, com média de 126 *spots*. Sendo assim, o café que apresentou um número maior de *spots*, é correspondente ao genótipo utilizado como testemunha. Isso se deve ao fato dos seus géis apresentarem um grupo de *spots* só definidos nesse genótipo, não sendo encontrados nos demais como será demonstrado nas análises seguintes.

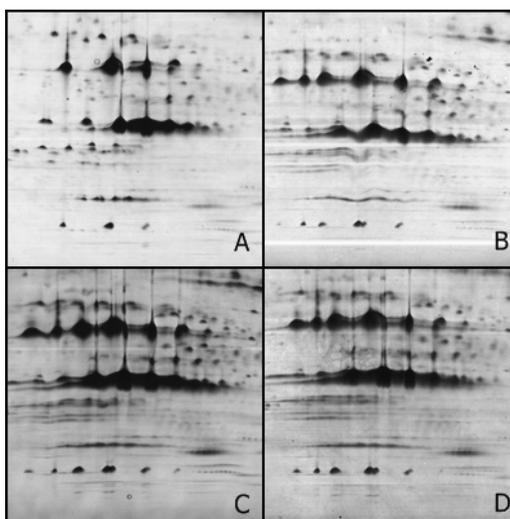


Figura 8 Géis bidimensionais referentes ao: (A) café de melhor qualidade sensorial – G1 , (B) café de menor qualidade – G2 , (C) café de qualidade variável – G3 de acordo com o ambiente de cultivo e (D) testemunha – G4

4.2.2 Análises comparativas

Primeiramente os genótipos de Bourbon foram comparados a testemunha e, em seguida, comparados entre si como demonstrado a seguir.

4.2.2.1 Testemunha (Mundo Novo) x Bourbons

Foram encontrados diversos pontos proteicos diferencialmente expressos entre a testemunha e os genótipos de Bourbon.

4.2.2.1.1 Mundo Novo (G4) x Bourbon de notas altas (G1)

Após o alinhamento, 97,6% dos *spots* formaram grupos. E a partir da análise por porcentagem de volume, foram encontrados 18 *spots* com diferenças quantitativas variando de 2X até 23X (Tabela 7).

Tabela 7 Volume relativo dos *spots* das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e resultado significativo no teste *t-student* ($p < 0,05$)

SPOT	Volume relativo dos <i>spots</i>		Variação relativa
	Bourbon de maiores notas (G1)	Mundo Novo (G4)	
790	0,28++	0,14	2,00 X
1011	0,44++	0,17	2,58 X
673	0,50++	0,14	3,57 X
777	0,54++	0,06	9,00 X
1167	0,05++	0,01	5,00 X
816	1,16++	0,33	3,51 X
2146	0,09++	0,03	3,00 X
872	0,56++	0,14	4,00 X
1300	1,39++	0,28	4,96 X
935	0,75++	0,28	2,67 X
715	0,54++	0,18	3,00 X
1304	0,43++	0,11	3,90 X
2160	0,3++	0,06	5,00 X

“continua”

Tabela 7 “conclusão”

SPOT	Volume relativo dos <i>spots</i>		Variação relativa
	Bourbon de maiores notas (G1)	Mundo Novo (G4)	
2162	0,2++	0,04	5,00 X
813	0,26++	0,05	5,20 X
867	0,56++	0,14	4,00 X
2152	0,46++	0,02	23,00X
1623	0,20++	0,05	4,00 X

Os valores representam as médias da porcentagem de volume das proteínas em triplicatas.

Em todos os *spots*, houve abundância proteica maior no café de notas mais altas em relação à testemunha (Figura 9). Quantitativamente o *spot* que mais se destacou, foi o *spot* 2152, com um aumento de 23X no Bourbon em relação à testemunha.

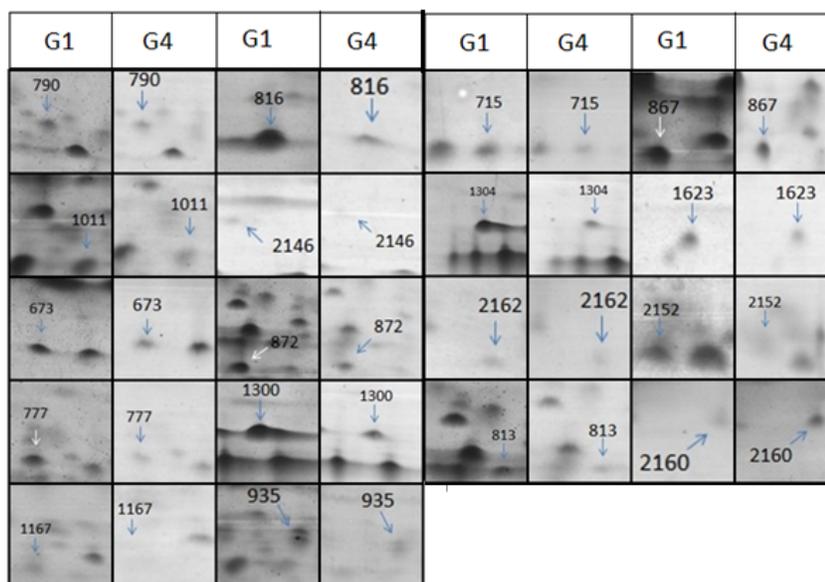


Figura 9 Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os 18 *spots* com diferença de abundância proteica significativa

Comparando tais resultados com a mesma análise realizada em São Sebastião da Gramma, nota-se aumento na quantidade de *spots* com diferenças

proteicas significativas. Na análise realizada com as amostras de São Sebastião da Grama, foram obtidos 7 *spots*, enquanto que nas análises de Lavras, 17. Dentre esses resultados, apenas um *spot* foi semelhante nas duas análises (715). Porém, relações entre a variação no número de *spots* diferencialmente expressos e a qualidade não são conhecidas e não se mostram presentes nos resultados desse experimento.

4.2.2.1.2 Mundo Novo (G4) x Bourbon de menores notas (G2)

Após o alinhamento, 94,16% dos *spots* formaram grupos. E a partir da análise por porcentagem de volume, foram encontrados 11 *spots* com diferenças quantitativas variando de 2,00X até 4,85X (Tabela 8).

Tabela 8 Volume relativo dos *spots* das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e resultado significativo no teste *t-student* ($p < 0,05$)

SPOT	Volume relativo dos <i>spots</i>		Variação relativa
	Mundo Novo (G4)	Bourbon de notas mais baixas (G2)	
2160	0,06	0,25++	4,16
775	0,03	0,06++	2
1304	0,11	0,41++	3,72
669	0,03	0,18++	6
867	0,14	0,56++	4
822	0,35	0,75++	2,14
1623	0,03	0,07++	2,3
673	0,14	0,52++	3,71
2162	0,04	0,17++	4,25
714	0,02	0,07++	3,5
1300	0,28	1,36++	4,85

Os valores representam as médias da porcentagem de volume das proteínas em triplicatas.

Nessa análise, todos os *spots* diferencialmente expressos apresentaram uma abundância proteica maior no tratamento Bourbon G2 em relação ao

Mundo Novo (Figura 10). O *spot* 669 se destaca quantitativamente, por apresentar um aumento no volume proteico de 6X no Bourbon.

Fazendo uma relação com a mesma análise realizada em São Sebastião da Grama, nota-se uma grande variação no número de *spots* com diferença de abundância proteica significativa, sendo que em Lavras, foram encontrados 11 *spots* e em São Sebastião da Grama, 2 não havendo nenhum ponto proteico comum entre elas.

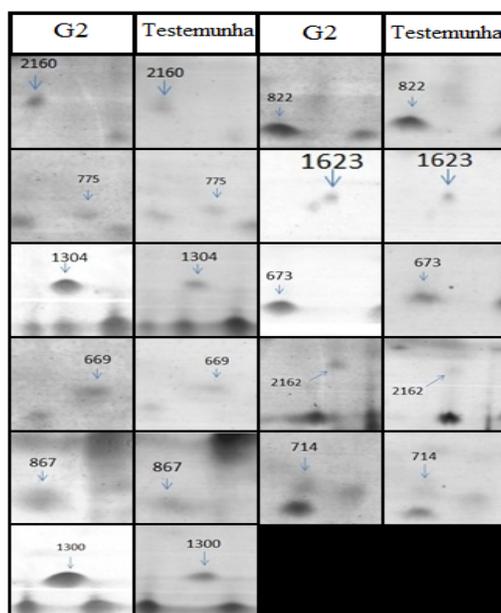


Figura 10 Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os 11 *spots* com diferença de abundância proteica significativa

4.2.2.1.3 Mundo Novo (G4) x Bourbon de notas variáveis (G3)

Após o alinhamento 95,28% dos *spots* formaram grupos. E a partir da análise por porcentagem de volume, foi possível a identificação de cinco *spots* que apresentação uma variação diferencial entre 3,16X e 4,64X (Tabela 9).

Tabela 9 Volume relativo dos *spots* das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e resultado significativo no teste *t-student* ($p < 0,05$)

SPOT	Volume relativo dos <i>spots</i>		Variação relativa
	Mundo Novo (G4)	Bourbon de notas variáveis (G3)	
2158	0,14++	0,04	3,50 X
1011	0,17	0,38++	3,16 X
1305	0,80++	0,20	4,00 X
803	0,07	0,31++	4,42 X
1309	0,79++	0,17	4,64 X

Os valores representam as médias da porcentagem de volume das proteínas em triplicatas.

De todos esses *spots*, em apenas 2 houve abundância proteica maior no Bourbon (G3) em relação à testemunha Mundo Novo (Figura 11). Quantitativamente, os *spots* que mais se destacaram foram 803 e 1309, com aumento de 4,42X e 4,64X, respectivamente.

Comparando a quantidade de *spots* aqui encontrada com a mesma análise realizada em São Sebastião da Gramma, não houve uma grande variação, já que em nessa cidade foram encontrados 8 *spots* e em Lavras, 5, não existindo nenhum *spot* em comum nas comparações.

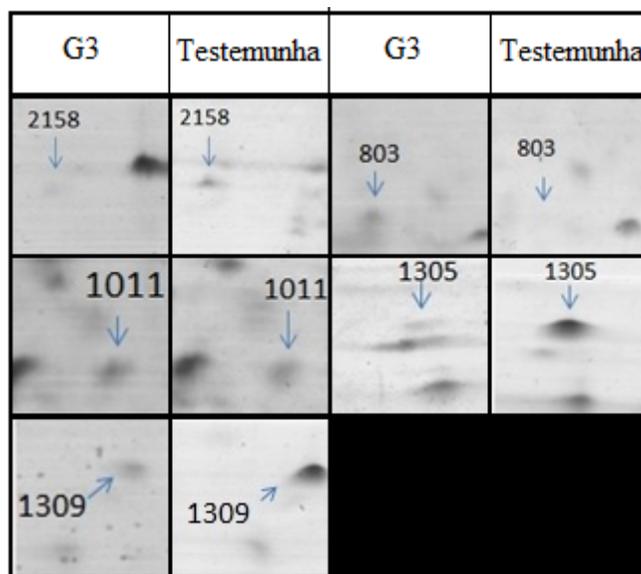


Figura 11 Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os cinco *spots* com diferença de abundância proteica significativa

Fazendo uma análise geral entre a testemunha e os três genótipos de Bourbon, nenhum *spot* apresentou diferenças quantitativas nas três análises simultaneamente. Porém, houve pontos proteicos com diferenças de abundância em duas análises, como o *spot* 1011 que está presente na comparação entre G4 e o G3, sendo mais expresso em G3 que teve maior nota em Lavras e também foi diferencialmente expresso na comparação entre G4 e G1, sendo mais expresso em G1 que é o genótipo de notas altas. Esses resultados sugerem que este *spot* possa estar relacionado com a melhor qualidade. Já os *spots* 2160, 1304, 669, 1623, 673, 772, 2162, 1300 apresentaram diferenças quantitativas nas análises entre G4 e G1 e nas análises entre o G4 e G2, ficando difícil relacioná-los com a qualidade, já que apareceram tanto no café de melhor qualidade sensorial, como no de menor. Outro ponto interessante, quanto aos *spots* com variação proteica obtidos na análise, é que esses apresentam-se com maior abundância proteica em G1 e G2 quando comparados à testemunha, mas o mesmo não acontece com o

G3, onde, em média, existem mais *spots* com maior expressão na testemunha. O mesmo resultado relacionado à variação de abundância foi encontrado nas primeiras análises, onde os mesmo genótipos foram comparados, porém cultivados em São Sebastião da Grama.

4.2.2.2 Análises entre Bourbons

Foram encontrados diversos pontos proteicos diferencialmente expressos entre os genótipos de Bourbon.

4.2.2.2.1 Bourbon de notas variáveis (G3) x Bourbon de notas altas (G1)

Para a quarta análise, foram utilizados os respectivos tratamentos, G3 e G1. Após o alinhamento, 96,2% dos *spots* formaram grupos. Com a comparação dos *spots* por diferença de porcentagem de volume, foram encontrados 9 *spots* com diferenças quantitativas variando de 2,05 X até 4,3X (Tabela 10).

Tabela 10 Volume relativo dos *spots* das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e resultado significativo no teste *t-student* ($p < 0,05$)

SPOT	Volume relativo dos <i>spots</i>		Variação relativa
	Bourbon de notas variáveis (G3)	Bourbon de notas altas (G1)	
715	0,24	0,54++	2,25
707	0,03	0,11++	3,66
804	0,06	0,20++	3,33
1300	0,39	1,39++	3,56
2149	0,72	1,48++	2,05
935	0,30	0,75++	2,5
1305	0,20	0,86++	4,3
2161	0,02	0,10++	5
1623	0,08	0,23++	2,85

Os valores representam as médias da porcentagem de volume das proteínas em triplicatas.

Nessa análise, os nove *spots* diferencialmente expressos apresentaram uma abundância proteica maior no tratamento G1 em relação ao G3 (Figura 12).

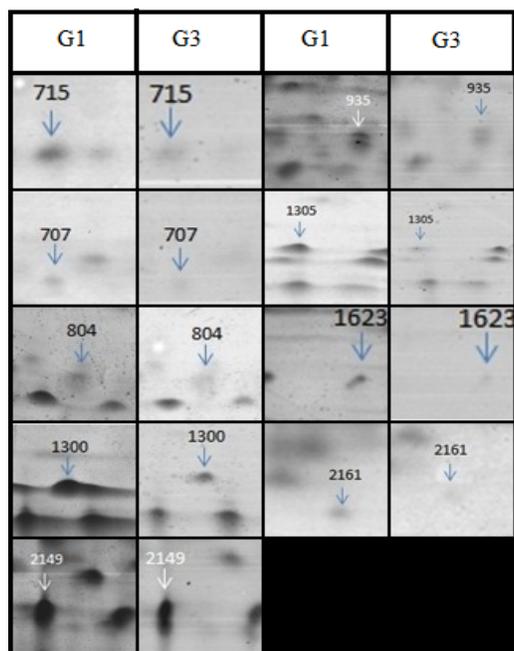


Figura 12 Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os 11 *spots* com diferença de abundância proteica significativa

Fazendo uma correlação desses resultados com a mesma análise realizada em São Sebastião da Gramma, nota-se que o número de *spots* encontrados não teve muita variação, sendo que em Lavras foram nove e em São Sebastião da Gramma, 10, com apenas um *spot* semelhante entre as análises (1300). Mas o padrão de predominância de maior abundância dos *spots* pelo Bourbon de maiores notas (G1) foi mantido.

4.2.2.2 Bourbon de notas variáveis (G3) e Bourbon de notas baixas (G2)

Após o alinhamento, 90,5% dos *spots* formaram grupos. Com a comparação dos *spots* por porcentagem de volume, foram encontrados oito *spots* com diferenças quantitativas variando de 2,00 X até 6,00X (Tabela 11).

Tabela 11 Volume relativo dos *spots* das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e um resultado significativo no teste *t-student* ($p < 0,05$)

SPOT	Volume relativo dos <i>spots</i>		Variação relativa
	Bourbon de notas baixas (G2)	Bourbon de notas variáveis (G3)	
775	0,06++	0,01	6,00
2158	0,15++	0,07	2,14
673	0,52++	0,20	2,6
2149	0,74	1,48++	2,00
1148	0,22++	0,07	3,14
822	0,75++	0,33	2,27
804	0,14++	0,06	2,33
1300	1,36++	0,39	3,48

Nessa análise, com exceção do *spot* 2149, todos os demais diferencialmente expressos apresentaram uma abundância proteica maior no tratamento G2 em relação ao G3 (Figura 13).

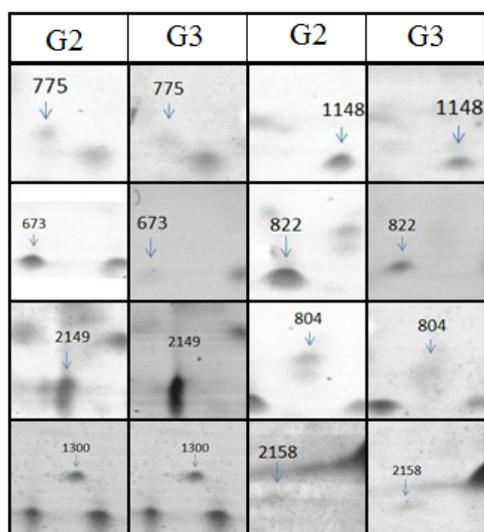


Figura 13 Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os 8 *spots* com diferença de abundância proteica significativa

4.2.2.2.3 Bourbon de melhores notas (G1) x Bourbon de notas baixas (G2)

Foram encontrados dois *spots* apresentando diferenças quantitativas em relação à percentagem de volume (Tabela 12). Após o alinhamento, 90,22% dos *spots* formaram grupos.

Tabela 12 Volume relativo dos *spots* das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e resultado significativo no teste *t-student* ($p < 0,05$)

SPOT	Volume relativo dos <i>spots</i>		Variação relativa
	Bourbon de melhores notas (G1)	Bourbon de notas baixas (G2)	
2170	0,08++	0,02	4,00
1623	0,23++	0,07	3,28

Os valores representam as médias da percentagem de volume das proteínas em replicatas.

Nos dois *spots*, houve uma abundância proteica maior no Bourbon de melhores notas (G1) em relação ao Bourbon de notas baixas (G2).

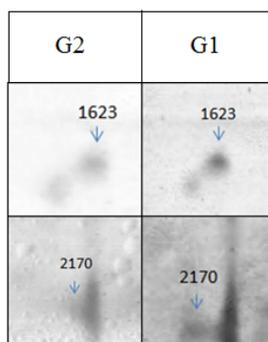


Figura 14 Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os 10 *spots* com diferença de abundância proteica significativa

Quando se faz a análise do Bourbon de melhores notas (G1) em relação aos demais genótipos, todos os *spots* com diferenças na quantidade proteica apresentam maior abundância no genótipo em questão. Esses dados reforçam a afirmação das análises de São Sebastião da Gramma, de que esse fato pode estar associado à melhor qualidade da bebida apresentada por esse genótipo, além de mostrar que nos dois ambientes onde foi cultivado, mesmo com as variações edafoclimáticas, o genótipo manteve a maior expressão das proteínas. Nessa comparação geral, destaca-se um *spot* que mostrou diferenças quantitativas em comum em duas análises, o *spot* 1623, com maior expressão em G1, quando comparado com G3 e G2, podendo ser mais um *spot* correlacionado a melhor bebida apresentada por esse genótipo. Já com relação ao número de *spots* diferencialmente expressos, quando se compara com a mesma análise realizada com amostras de São Sebastião da Gramma foram encontrados o dobro de *spots*, já que em São Sebastião da Gramma, foram num total de 4, não havendo nenhum *spot* em comum entre as análises. A Tabela 13 é representativa da variação do

número de *spots* diferencialmente expressos entre as análises realizadas com o genótipo em questão nos dois ambientes.

Tabela 13 Variação no número de pontos proteicos com diferenças de abundância entre as mesmas análises realizadas nas cidades de Lavras e São Sebastião da Grama São Sebastião da Grama

G1 x G4		G2 x G1		G1 x G3	
Lavras	São Sebastião da Grama	Lavras	São Sebastião da Grama	Lavras	São Sebastião da Grama
7	17	2	4	9	10

O genótipo de Bourbon de menores notas (G2) quando comparado aos demais, não apresentou nenhum *spot* diferencialmente expresso em comum nas três comparações, porém todos os *spots* assim considerados apresentaram abundância proteica maior no genótipo em questão em relação ao genótipo Mundo Novo, já em relação ao Bourbon de notas variáveis (G3), de oito *spots* assim considerados, sete também são mais expressos no genótipo em questão e em relação ao Bourbon de notas maiores (G1), todos os *spots* são menos expressos no G2. Alguns *spots* foram diferencialmente expressos em duas análises simultaneamente, na comparação entre G2 e a testemunha, e também na comparação entre, G2 e G3, são eles: 775, 673, 1300, sendo que nos dois casos, a maior expressão foi em G2, talvez, esses *spots* podem ser responsáveis pela menor qualidade de G2, porém a testemunha tem nota menor que G2 em Lavras, porém uma diferença pequena. Quanto ao número de *spots* diferencialmente expressos comparando a análises da cidade de Lavras e São Sebastião da Grama, uma maior variação só foi encontrada quando o genótipo em questão foi comparado à testemunha, como mostrado na Tabela 14.

Tabela 14 Variação no número de pontos proteicos diferencialmente expressos entre as mesmas análises realizadas nas cidades de Lavras e São Sebastião da Grama

G1 x G4		G2 x G1		G1 x G3	
Lavras	São Sebastião da Grama	Lavras	São Sebastião da Grama	Lavras	São Sebastião da Grama
11	2	2	4	8	6

Fazendo uma comparação geral, do genótipo Bourbon de notas variáveis (G3), com os demais, isto é, Mundo Novo, Bourbon de notas maiores (G1) e Bourbon de notas baixas (G2), observa-se que em geral os pontos proteicos com diferenças de abundância são sempre menos expressos em G3. Nenhum ponto proteico apresentou diferenças de expressão em todos os casos. Entretanto, houve semelhanças entre duas análises, como o *spot* 2158 que foi assim considerado tanto na comparação entre a testemunha e G3 como na comparação entre G3 e G2. Porém, uma explicação não é possível, porque na comparação G3x G2, a maior expressão é vista no genótipo de menores notas (G2), nesse caso, seria plausível afirmar que sua maior abundância contribuiria para uma bebida de menor qualidade, entretanto, na comparação G3 x testemunha a maior expressão é vista na testemunha, que em Lavras teve maior nota (quadro 1) que o genótipo, anulando essa explicação. Já os *spots* 804, 1300 e 2149 mostraram diferenças na porcentagem de volume tanto na comparação G3 e G2 como na comparação G3 e G1, porém, os *spots* 804 e 1300, não permitem relação com a qualidade, já que são mais expressos nos genótipos de melhor e pior nota em relação ao genótipo variável, já o *spot* 2149, apresenta maior abundância no genótipo de notas variáveis quando comparado a G2 e menor abundância quando comparado a G1, podendo estar correlacionado a melhor qualidade da bebida, já que sua maior abundância prevaleceu nos genótipos que obtiveram notas maiores nas duas comparações. Não houve grande variação quanto ao número de *spots* com diferença significativa quando comparou-se as mesmas

análises de Lavras envolvendo esse genótipo com São Sebastião da Grama como representado na Tabela 15.

Tabela 15 Variação no número de pontos proteicos diferencialmente expressos entre as mesmas análises realizadas nas cidades de Lavras e São Sebastião da Grama

G1 x G4		G2 x G1		G1 x G3	
Lavras	São Sebastião da Grama	Lavras	São Sebastião da Grama	Lavras	São Sebastião da Grama
5	8	9	10	6	8

4.2.3 *Spots* candidatos mais relevantes

Alguns *spots* dão maiores indícios de serem influenciadores na qualidade da bebida dos cafés estudados. Destaca-se, o *spot* 1623 por ser considerado diferencialmente expressos nas análises envolvendo o genótipo de melhor bebida (G1), com os demais Bourbons, sendo que esse foi sempre mais expresso por tal genótipo. Entretanto, o mesmo *spot* não foi considerado diferencialmente expresso nas análises com amostras precedentes da cidade de São Sebastião da Grama.

Outro *spot* interessante é o 715, que nas análises de São Sebastião da Grama, manteve uma expressão diferencial quando todos os genótipos de Bourbon foram comparados com a testemunha, mostrando que o *spot* foi sempre mais expresso nos Bourbons. Já nas análises de Lavras, ao fazer a mesma comparação, isto é, dos Bourbons com a testemunha, o mesmo *spot* só foi considerado diferencialmente expresso na comparação entre a testemunha e o genótipo de melhor qualidade de bebida (G1), sendo que com relação à variação da abundância, o padrão de São Sebastião da Grama foi mantido, onde o café de melhor nota apresenta maior expressão que a testemunha. Esse resultado, pode significar que, independente do ambiente, o genótipo de melhor nota (G1)

mantém uma maior expressão desse *spot*, o que não acontece com os Bourbons de notas variáveis (G3) e de notas baixas, (G2), que no ambiente de Lavras (menos favorável que São Sebastião da Grama), não mostraram diferenças quanto ao volume do *spot* em relação à testemunha. Isso pode significar que esse *spot* pode estar relacionado com a bebida inferior por eles produzida, devido à ausência de uma maior expressão.

O *spot* 2152 também é curioso, por ter sido 23x mais expresso em G1 quando comparado à testemunha.

4.3 Análises Comparativas entre os cafés cultivados nas cidades de São Sebastião da Grama e Lavras

Foram encontrados diversos pontos protéicos diferencialmente expressos nas comparações entre um mesmo genótipo quando cultivado nas duas regiões diferentes, como mostrado abaixo.

4.3.1 Bourbon de notas altas (G1) cultivado em Lavras e em São Sebastião do Grama

Nesta análise foram encontrados cinco *spots* apresentando diferenças quantitativas em relação à porcentagem de volume (Tabela 16). Após o alinhamento, 92,06% dos *spots* formaram grupos.

Dentre as análises comparativas entre os ambientes, esta foi a que apresentou um maior número de pontos proteicos considerados diferencialmente expressos. Verifica-se que houve uma maior abundância proteica no ambiente São Sebastião da Grama, onde G1 apresentou notas ligeiramente mais baixas em relação a Lavras (Tabela 1). Portanto, ainda que esses *spots* não tenham se associado diretamente a maior nota, é provável que eles sejam expressos em genótipos de boa qualidade de bebida, uma vez que as notas entre as duas localidades não foram discrepantes.

Tabela 16 Volume relativo dos *spots* das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e um resultado significativo no teste *t-student* ($p < 0,05$)

SPOT	Bourbon de notas altas – G1		Variação relativa
	Volume relativo dos <i>spots</i>		
	Lavras	São Sebastião da Grama	
2193	0,06	0,20 ++	3,33
2195	0,03	0,07 ++	2,33
2171	0,07	0,38 ++	5,42
2174	0,06	0,25 ++	4,16
2189	0,03	0,17 ++	5,66

Esses dados podem ser reforçados, quando se faz uma comparação aos resultados das análises dos genótipos cultivados apenas na cidade de São Sebastião da Grama, onde o *spot* 2189 se destacou por apresentar diferenças de expressão em duas comparações, G1 x G3 e G1 X G4. Em ambas as situações a maior expressão se deu em G1, mesmo na cidade de Lavras, onde G4 obteve maiores notas que G1. Esse resultado indica que o *spot* 2189 apresenta sua maior expressão nos genótipos de maior nota, e que o nível de expressão ideal capaz de resultar em notas melhores, é o que está presente em G4. A Tabela 22 ilustra essa suposição, pois esse *spot* foi mais abundante quando G1 foi cultivado em São Sebastião do Grama. Entretanto G1 apresentou nota sensorial mais alta na cidade de Lavras, mostrando com isso que sua expressão em níveis não tão altos propicia uma bebida de qualidade superior.

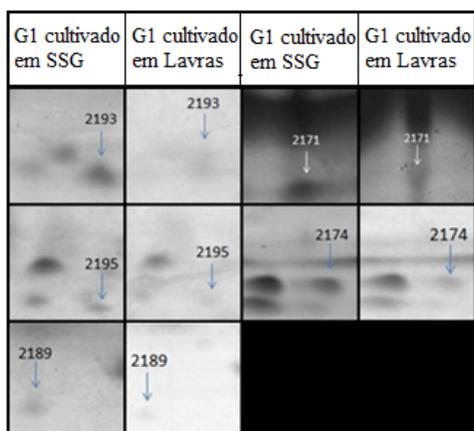


Figura 15 Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os cinco *spots* com diferença de abundância proteica significativa

4.3. 2 Bourbon de notas baixas (G2) cultivado em Lavras e São Sebastião da Grama

Foram encontrados dois *spots* apresentando diferenças quantitativas em relação à percentagem de volume (Tabela 17). Após o alinhamento, 86,8% dos *spots* formaram grupos.

Tabela 17 Volume relativo dos *spots* das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e um resultado significativo no teste *t-student* ($p < 0,05$)

SPOT	Bourbon de notas baixas – G2		Variação relativa
	Volume relativo dos <i>spots</i>		
	Lavras	São Sebastião da Grama	
673	0,52 ++	0,26	2,00
652	0,24	0,63 ++	2,62

Nos pontos proteicos considerados diferencialmente expressos, não houve uma predominância de maior abundância em um determinado ambiente (Figura 16). Sugere-se que o ponto proteico 673, de maior expressão em Lavras possa estar contribuindo para a maior nota nesse ambiente encontrada na análise

sensorial. Porém, devido ao fato desses *spots* não apresentarem diferenças quantitativas nas demais análises entre os ambientes, sugere-se que esses pontos proteicos aqui citados, estejam eles apresentando maior ou menor expressão em cada ambiente, podem estar influenciando de forma negativa na qualidade da bebida.

Resultados obtidos na comparação dos genótipos quando cultivados apenas na cidade de Lavras, corroboram com essa explicação, onde o ponto proteico 673 foi considerado diferencialmente expresso em duas comparações envolvendo o genótipo de menores notas (G2), sendo elas, G4 x G2 e G3 x G2. Nos dois casos, esse ponto proteico foi mais expresso em G2, porém a testemunha G4, apresentou notas inferiores a G2 em Lavras, mas com uma diferença pequena.

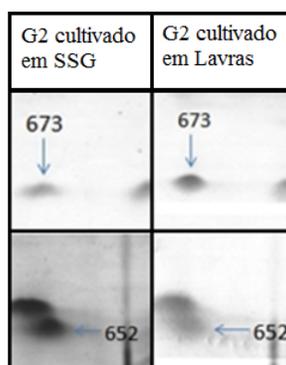


Figura 16 Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os 2 *spots* com diferença de abundância proteica significativa

4.3. 3 Bourbon de notas variáveis (G3) cultivado em Lavras e em São Sebastião do Grama

Foi encontrado apenas um *spot* apresentando diferença quantitativa em relação à porcentagem de volume (Tabela 18). Após o alinhamento, 92,22% dos *spots* formaram grupos.

Tabela 18 Volume relativo dos *spots* das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e um resultado significativo no teste *t-student* ($p < 0,05$)

<i>SPOT</i>	Bourbon de notas baixas – G2		Varição relativa
	Volume relativo dos <i>spots</i>		
	Lavras	São Sebastião da Grama	
1619	0,76 ++	0,28	2,71

A presença de apenas um *spot* diferencialmente expresso nesta análise (Figura 17), talvez possa ser relacionada à ausência de um grupo de proteínas nesse genótipo que influencie diretamente na qualidade final da bebida, já que esse genótipo foi o que apresentou uma variação de notas de acordo com seu ambiente de cultivo. Espera-se que caso houvesse tal grupo, os *spots* apresentariam uma diferença na sua expressão de acordo com o ambiente. O mesmo *spot* (1619), não teve diferença de expressão nas análises dos genótipos quando cultivados somente na cidade de Lavras e somente em São Sebastião da Grama.

É sabido que nem todas as proteínas são benéficas a qualidade da bebida, podendo algumas serem capazes de causarem transformações negativas quando expressas em níveis inadequados. Amorim (1978) afirma que as proteases são responsáveis por algumas transformações químicas negativas que ocorrem no grão colaborando. Sendo assim, a maior expressão desse tendo ocorrido em Lavras, pode ser uma resposta ao ambiente menos favorável, fazendo com que diminua a qualidade.



Figura 17 Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando o *spot* com diferença de abundância proteica significativa

4.3.4 Mundo Novo (G4) cultivado em Lavras e Sebastião da Grama

Foram encontrados cinco *spots* apresentando diferenças quantitativas em relação à porcentagem de volume (Tabela 19). Após o alinhamento, 89,6% dos *spots* formaram grupos.

Tabela 19 Volume relativo dos *spots* das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de pelo menos 2X e um resultado significativo no teste *t-student* ($p < 0,05$)

SPOT	Mundo Novo (Testemunha) Volume relativo dos <i>spots</i>		Variação relativa
	Lavras	São Sebastião da Grama	
777	0,07	0,32 ++	4,57 X
867	0,14	0,29 ++	2,07 X
2162	0,04	0,14 ++	3,5 X
1309	0,75 ++	0,18	4,16 X
1335	0,03	0,11 ++	3,66 X

Os dados mostram que dos cinco *spots* diferencialmente expressos, apenas um apresenta uma maior abundância nos géis de São Sebastião da Grama em relação a Lavras (Figura 18), sendo que G4 apresentou melhores notas na primeira cidade.

Fazendo uma correlação com os resultados da análise feita com os cafés cultivados em Lavras o *spot* 777 foi diferencialmente expresso na comparação

entre testemunha (G4) e café de notas altas (G1). Sendo a sua maior expressão em G1, isso mostra que talvez sua maior expressão, tenha colaborado para a melhor qualidade da bebida expressa em G1. Segundo Fazuoli et al. (2005), o cultivo de Bourbon é indicado em regiões com altitudes acima de 1000m, estando o ambiente São Sebastião da Grama a uma altitude mais favorável (1300m) que a cidade de Lavras (950m) para o plantio de café de qualidade superior e se após a identificação desses *spots* estes forem correlacionados a qualidade da bebida, faz sentido que a maior expressão seja encontrada em tal ambiente.

O *spot* 867 também pode ser correlacionado, pois nessa análise sua maior expressão foi no genótipo que teve melhor nota (G1 cultivado em São Sebastião da Grama), o mesmo foi visto nas análises dos cafés cultivados somente em Lavras e somente em São Sebastião da Grama. Nas análises comparativas onde os genótipos foram comparados sendo cultivados somente em Lavras, o *spot* foi sempre mais expresso no genótipo de maior nota, corroborando com essa afirmação. Assim, foi diferencialmente expresso na comparação entre G4 e G1, com maior expressão em G1 e na comparação entre G4 e G2, onde a maior expressão foi em G2, que mesmo sendo o café que manteve notas baixas três ambientes da análise sensorial, em Lavras, teve uma nota maior que a testemunha. Já nas análises somente de São Sebastião da Grama relacionadas à testemunha, o *spot* 867 só foi diferencialmente expresso, quando a testemunha foi comparada ao genótipo que apresenta variações de nota entre os ambientes (G3), sendo que a maior expressão foi em G4 que teve nota mais alta da cidade de Lavras.

O *spot* 2162 na presente análise foi mais abundante no genótipo que obteve melhor nota (G1 cultivado em São Sebastião da Grama), o mesmo foi visto nas análises dos genótipos cultivados somente em Lavras, onde foi considerado diferencialmente expresso quando a testemunha (G4) foi comparada

a G1, onde a abundância proteica foi maior em G1 e quando comparado a G2, sendo a maior abundância proteica em G2 que apesar de ser o genótipo que manteve notas ruins na análise sensorial, na cidade de Lavras, apresenta nota maior que a testemunha.

Já o *spot* 1309 que aqui se mostrou mais abundantes no genótipo de menor nota (G4 cultivado em Lavras), também apresentou esse padrão nas análises dos genótipos cultivados somente em Lavras. Nas análises dos genótipos cultivados somente em Lavras, o ponto proteico 1309 foi diferencialmente expresso somente quando a testemunha (G4) foi comparada ao genótipo de notas variáveis (G3), sendo mais abundante na testemunha (G4), que teve maior nota que G3.

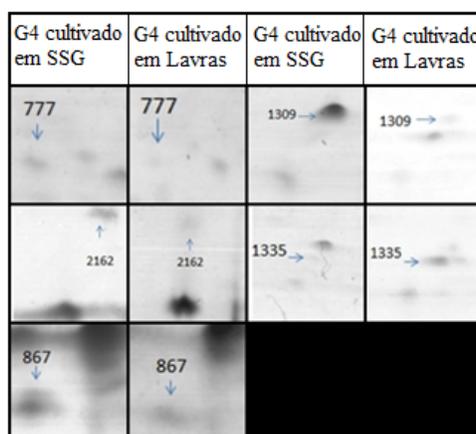


Figura 18 Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais, mostrando os cinco *spots* com diferença de abundância proteica significativa

Resultados interessantes foram encontrados nessa análise, devido à presença de *spots* que só se definem nos géis referentes à testemunha cultivada em Lavras, impossibilitando a análise diferencial, já que não estão presentes nos demais géis, mas podendo citá-los como ausentes (Figura 19). São possíveis algumas suposições para o fato, como por exemplo, alguma falha na técnica durante a eletroforese bidimensional, mas seria muito inviável que isso se

repetisse em triplicata. Uma abundância maior na quantidade de proteínas também pode ser uma justificativa, fazendo com que essas se definam melhor, já que a eletroforese bidimensional não é tão sensível na detecção de *spots* muito pequenos (LANÇAS et al., 2003). Entretanto, também é plausível que esses pontos proteicos possam realmente estar presentes somente nesses géis.

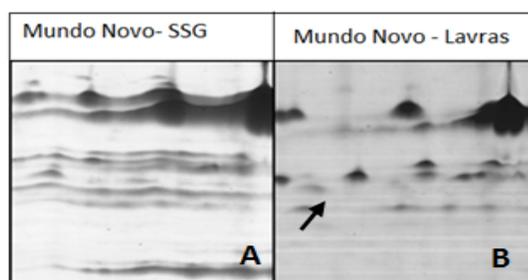


Figura 19 Detalhes dos *spots* só definidos nos géis referentes ao Mundo Novo cultivados em Lavras destacados pela seta. A figura de letra A, representa o gel do genótipo cultivado em São Sebastião da Gramma e a figura B, o mesmo cultivado em Lavras

Outro fato importante encontrado nessa análise foi a ausência de alguns *spots* nos géis de Lavras, que de acordo com a literatura, pode-se inferir como sendo proteínas de reserva. Segundo Koshino et al. (2007) o fruto de café contém tecidos especializados para a deposição de proteínas de reserva durante a maturação, sendo estas as mais predominantes nos grãos após o desenvolvimento. Os autores ainda afirmam que as proteínas de reserva 11S são as globulinas mais abundantes na semente de café agindo como fonte de nitrogênio nas reações de torra e garantindo o sabor e aroma característicos. Entretanto, Montavon, Mauron e Duruz (2003) afirmam que ainda não há evidências concretas de que proteínas de reserva das sementes de café possam agir como precursores de aroma e sabor através de sua degradação por proteases específicas. Os *spots* de proteínas de reserva devido a sua abundância, muitas vezes são indefinidos, apresentando certo arraste e impossibilitando as análises

diferenciais, porém, nos géis referentes à testemunha cultivada em Lavras, é nítida a ausência de um desses *spots* (Figura 20). Isso não é uma grande surpresa, já que a variedade Mundo Novo é o único fruto vermelho nas análises e é sabido que frutos vermelhos e amarelos respondem de formas diferenciadas a ação do ambiente.

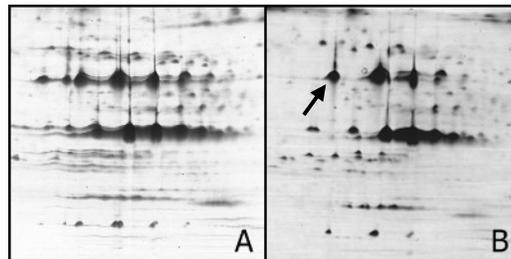


Figura 20 Detalhes mostrando a ausência de *spots* supostamente de reserva no Mundo Novo cultivado em Lavras destacados pela seta. A figura de letra A, representa o gel do genótipo cultivado em São Sebastião da Grama e a figura B, o mesmo cultivado em Lavras.

6 CONCLUSÃO

- a) Não foi possível relacionar número de *spots* com diferenças significativas de abundância proteica e a qualidade de bebida.
- b) Foram obtidos diversos *spots* diferencialmente expressos entre os genótipos.
- c) Em ambas as localidades, os genótipos Bourbons independentemente das notas recebidas na avaliação sensorial apresentaram, de maneira geral, maior abundância proteica nos pontos proteicos diferencialmente expressos em relação ao Mundo Novo.
- d) Nas duas localidades a análise individualizada dos *spots* revelou que houve maior abundância dos *spots* em G1 quando comparado aos outros genótipos. Esses *spots*, provavelmente poderão ser utilizados como marcadores genotípicos de cafés com alta qualidade de bebida.
- e) Na comparação entre Bourbons da maior (G1) e menor (G2) notas todos os pontos protéicos considerados diferencialmente expressos, apresentaram maior abundância no primeiro, podendo estar associados com maiores notas de qualidade sensorial.
- f) Supõe-se que o genótipo com variações de notas na análise sensorial (G3), não tenha nenhum grupo de proteínas que caracterizam a qualidade de bebida.
- g) Alguns *spots* apresentaram maiores evidências de que contribuem para uma melhor qualidade da bebida, como por exemplo, 1623, 715, 2193, 2195, 2171, 2174, 2189, 777, 867 e 2162

- h) Os spots 1309, 673 e 652 apresentaram fortes evidências de que contribuem negativamente na qualidade da bebida.
- i) Na comparação entre os ambientes, em média, os *spots* que apresentaram diferenças significativas de abundância protéica são mais expressos na região mais favorável (São Sebastião da Grama).
- j) Esse experimento permite que vários outros sejam idealizados a partir de seus resultados e da continuidade do presente trabalho, com a identificação dos *spots*

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, S. A. **Qualidade da bebida e atividade antioxidante em *in vivo* e *in vitro***. 2007. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

ABREU, H. M. C. **Proteases e qualidade da bebida de cafés cultivados em regiões climatologicamente diferentes**. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

AFONSO JÚNIOR, P. C.; CORRÊA, P. C. Influência do tempo de armazenagem na cor dos grãos de café pré-processados por via seca e via úmida. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, p. 1268-1276, 2003.

AMORIM, H. F. **Aspectos bioquímicos e histoquímicos do grão de café verde relacionados com a deterioração de qualidade**. 1978. 85 p. Tese (Livre Docência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1978.

AMORIM, H. V.; SILVA, O. M. Relationship between the polyfenoloxidase activity of coffee beans and quality of beverage. **Nature**, New York, n. 219, p. 381-382, 1968.

BORÉM, F. M. **Cafeicultura empresarial: produtividade e qualidade**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 103 p. (Textos Acadêmicos).

BORÉM, F. M. Processamento do café. In: BORÉM, F. M. (Ed.). **Pós-colheita do café**. Lavras: UFLA, 2008. p. 127-158.

CAMARGO, A. P.; SANTINATO, R.; CORTEZ, J. G. Aptidão climática para qualidade da bebida nas principais regiões cafeeiras de Arábica do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 1., 1992, Araxá. **Anais...** Araxá: [s. n.], 1992. p. 70-74.

CARVALHO, V. D. et al. Relação entre a composição físico-química e química do grão beneficiado e a qualidade de bebida do café. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 449-454, mar. 1994.

CHAGAS, I. S. T. et al. Avaliação do mercado de cafés especiais. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociedade Rural, 47., 2009, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: SOBER, 2009. 1 CD ROM.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café 2012**. Disponível em: < http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_01_10_10_54_22_boletim_cafe_1a_estimativa.pdf>. Acesso em: 5 jan. 2012.

CORTEZ, J. G. Aptidão climática para qualidade da bebida nas principais regiões cafeeiras de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, p. 27-31, 1997.

DECAZY, F. et al. Quality of different Honduras coffee in relation to several environments. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 68, n. 7, p. 2356-2361, 2003.

DI CIERO, L.; BELLATO, C. M. Proteoma: avanços recentes em técnicas de eletroforese e espectrometria de massa. **Biotecnologia: Ciência & desenvolvimento**, Brasília, n. 29, p. 158-164, nov./dez. 2002.

FAVARIN, J. L. et al. Qualidade da bebida de frutos cereja submetidos a diferentes manejos pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 39, n. 2, p. 187-192, fev. 2004.

FAZUOLI, L. C. et al. Avaliação das cultivares Mundo Novo, Bourbon Amarelo e Bourbon Vermelho de *Coffea arabica* L. em Campinas, SP. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 3, p. 533-546, 2005.

FAZUOLI, L. C. et al. Cultivares de café arábica: um patrimônio da agricultura. **O agrônomo**, Campinas, v. 59, n. 1, p. 48-53, 2007.

FIGUEIREDO, L. P. **Perfil sensorial e químico de genótipos de cafeeiro Bourbon de diferentes origens geográficas**. 2010. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

GONZALEZ-RIOS, O. et al. Impacto f ecological pot-harvest processing on the volatile fraction of coffee beans: green coffee. **Journal of food Composition and Analysis**, San Diego, v. 20, p. 289-296, 2007.

GUIMARÃES, B. L. S. **Proteômica diferencial em clones de Coffea Canephora sob condições de déficit hídrico**. 2007. 59 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

HOFFMANN, C. E. **Resfriamento no processo de torra nas características de qualidade tecnológica e sensorial do café.** 2001. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2001.

KOSHINO, L. L. et al. Análise proteômica de embriões zigóticos e endosperma em sementes de *Coffea arabica*. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2007, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: [s. n.], 2007. 1 CD ROM.

LANÇAS, F. M. et al. A química analítica do proteoma. **Analytica**, São Paulo, v. 6, p. 60- 66, ago./set. 2003.

LEÃO, E. A.; PAULA, N. M. A produção de cafés especiais no Brasil e a emergência de novos padrões de competitividade. In: ENCONTRO REGIONAL DE ECONOMIA, 13., 2010, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: [s. n.], 2010.

LIVRAMENTO, K. G. **Proteômica diferencial de café arábica submetido a diferentes processamentos e secagem.** 2008. 67 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

LOPES, L. M. V. Avaliação da qualidade de grãos de diferentes cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) . **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, MG, n.1, p. 3-8, 2000.

LUDWING, E. et al. Investigations of peptides and proteases in green coffee beans. **European Food Research and Technology**, Berlin, n. 211, p. 111-116, 2000.

MENDES, A. N. G. et al. **Cafeicultura**. Lavras: INDI Gráfica, 2002. p. 317.

MENDONÇA, L. M. V. L. et al. Composição química de grãos crus de cultivares de *Coffea arabica* L. susceptíveis e resistentes a *Hemileia vastatrix* Berg et Br. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 413-419, mar./abr. 2007.

MONTAVON, P.; MAURON, A. F.; DURUZ, E. Changes in green coffee protein profiles during roasting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 2335-2343, 2003.

MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C.; DE MARIA, C. A. B. Componentes voláteis do café torrado. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 195-203, 2000.

MORICOCCHI, L.; MARTIN, N. B. Acordos internacionais e mercado de cafés. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 24, n. 7, p. 17-29, 1994.

NATIONAL COFFEE ASSOCIATION. **Coffee from around the world**. 2008. Disponível em: <<http://www.ncausa.org/i4a/pages/index.cfm?pageid=75>>. Acesso em: 2 mar. 2012.

ORTOLANI, A. A. et al. Clima e qualidade natural de bebida do café arábica no Estado de São Paulo. In: SIMPOSIO DA PESQUISA DE CAFES DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Resumos expandidos ...** Brasília: Embrapa Café, 2000. v. 1, p. 662-664.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, New York, v. 405, n. 6788, p. 837-846, 2000.

PIMENTA, C. J. **Qualidade do café (Coffea arabica L.) originado de diferentes frutos colhidos em quatro estágios de maturação**. 1995. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1995.

RAMOS, H. J. O. et al. **Análise proteômica do estresse hídrico em cafeeiro**. 2007. Disponível em: <<http://www.sbicafe.ufv.br/handle/10820/2027>>. Acesso em: 23 dez. 2011.

REINECCIUS, G. A. The maillard reaction and coffee flavor. In: COLLOQUIUM, 16., 1995, Kyoto. **Proceedings...** Paris: ASIC, 1995. p. 249-257.

ROCHA, T. L. et al. **Eletroforese bidimensional e análise de proteomas**. Brasília: Embrapa, 2005. Comunicado técnico.

ROSSETTI, R. P. **Determinação de fenóis totais em frutos do café: avaliações em diferentes fases de maturação**. 2007. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SALVADORAN COFFEE COUNCIL. **Exploring distinctive characteristics & Virtues of coffee varieties: the Bourbon e pacamara case**. 2009. Disponível em: <<http://www.atlascoffee.com/pacamara.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2010.

SARRAZIN, C. et al. Representativeness of coffee aroma extracts: a comparison of different extractions methods. **Food Chemistry**, London, v. 70, p. 99-106, 2000.

SCHALLER, A. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. **Planta**, Berlin, n. 220, p. 183-197, 2004.

SHIMIZU, M. M.; MAZZAFERA, P. Compositional changes of proteins and amino acids in germinating coffee seeds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, n. 43, p. 259-255, 2000.

SILVA, E. A. et al. The influence of water management and environmental conditions on the chemical composition and beverage quality of coffee beans. **Brazilian Journal Of Plant Physiology**, Piracicaba, n. 17, p. 229-238, 2005.

SILVA E SILVA, A. M.; CORRÊA, G. C.; REIS, E. M. Proteômica: uma abordagem funcional do estudo do genoma. **Saúde & ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 2, n. 2, p. 1-10, jul./dez. 2007.

SILVA, R. F.; PEREIRA, R. G. F. A. Qualidade do café cereja descascado produzido na região Sul de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 6, p. 1367-1375, 2004.

SOUZA, M. C. M.; SAES, M. S. M.; OTANI, M. N. Pequenos agricultores familiares e sua inserção no mercado de cafés especiais: uma abordagem preliminar. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 32, n. 11, p. 16-26, nov. 2002.

SPECIALITY COFFEE ASSOCIATION OF AMERICA. **What's special about specialty coffee?** Disponível em: <<http://scaa.org/pdfs/Press-What-is-Specialty-Coffee.pdf>>. Acesso em: 2 dez. 2011.

TAVEIRA, J. H. S. **Perfis protéicos de grãos de café submetidos a diferentes formas de processamento e secagem**. 2009. 79 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

TAUNAY, A. E. **História do café no Brasil: no Brasil Imperial 1822-1972**. Rio de Janeiro: Departamento Nacional do Café, 1939. v. 3.

ZYLBERSTAJN, D.; FARINA, M. M. Q. **Diagnóstico sobre sistema agroindustrial de cafés especiais e qualidade superior do Estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Sebrae, 2001.